

ÜBER MANDEL-D-OXYNITRILASE UND IHRE ISOENZYME

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans-Jürgen Aschhoff
Breslau

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

ÜBER MANDEL-D-OXYNITRILASE UND IHRE ISOENZYME



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans-Jürgen Aschhoff

Breslau

Marburg 1968



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 11.12.1968

Tag der mündlichen Prüfung am 18.12.1968

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Pfeil

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Kirmse

Teile dieser Arbeit sind erschienen in:

Biochem.Z. 346, 301 (1966)

Hoppe-Seyler's Z.Phys.Chem. 348, 1241 (1967)

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Die folgenden Seiten sind den Eltern gewidmet, die mich zu dem, was ich heute bin, gebracht haben.

Ich danke euch für eure Liebe, eure Unterstützung und eure Gebete.

Es ist ein Privileg, von euch zu leben und von euch zu lernen.

Ich hoffe, dass ich euch in Zukunft noch viele glückliche Momente bescheren kann.

Bitte, gebt mir weiterhin eure Unterstützung und euer Gebet.

Ich liebe euch sehr und danke euch sehr.

13. Schlusswort



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

a) Allgemeiner Teil	
1. Einleitung	1
2. Darstellung von hochreinem Mandel-D-Oxynitrilase - Gemisch	3
3. Mandel-D-Oxynitrilase - Isoenzyme	4
3.1 Ihre Darstellung	4
3.2 Charakterisierung	9
3.2.1 Aktivitätsmessungen	9
3.2.2 Immunologische Untersuchungen	11
3.2.3 Disc-Elektrophorese und elektro- phoretische Beweglichkeit	15
3.2.4 Isoelektrische Punkte	16
3.2.5 Absorptionsspektren	17
3.3 Aufbau- und Strukturunterschiede der einzelnen Isoenzyme	18
3.3.1 Molekulargewichte aus Diffusions- messungen an Gelgerüsten defi- nierter Porengröße	18
3.3.2 Bestimmung der Coenzyme	20
3.3.3 Untersuchungen am Proteinteil	21
3.3.3.1 qualitative Aminosäure- analyse	22
3.3.3.2 quantitative Bestimmung der neutralen und sauren Aminosäuren	26
3.3.4 Molekülform und -abmessungen durch Messung der Röntgen- kleinwinkelstrahlung	28
4. Zusammenfassung	39

B) Experimenteller Teil

	Seite
1. Modifiziertes Verfahren zur Darstellung von hochreiner Mandel-D-Oxynitrilase	42
2. Auftrennung der Mandel-D-Oxynitrilase in Isoenzyme	47
3. Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgel	55
4. Aktivitätsbestimmungen	56
5. Isoelektrische Fokussierung	58
6. Molekulargewichtsbestimmungen durch Diffusionsmessungen an Sephadex	61
7. Isolierung und Identifizierung der prosthetischen Gruppe der drei Isoenzyme	62
8. Immunologische Untersuchungen	64
9. Qualitative Aminosäureanalysen	66
10. Quantitative Aminosäureanalysen am Nanomol-Analyzer	68
11. Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung	70

Einleitung

Bisherige Arbeiten und Ergebnisse über Struktur und Eigenschaften der Mandel - D - Oxynitrilase.

L.ROSENTHALER fand im Jahre 1908, daß im sog. Emulsin aus Bittermandeln eine Substanz enthalten ist, die aus Benzaldehyd und Blausäure rechtsdrehendes, optisch aktives Mandelsäurenitril synthetisiert. Er nannte sie Oxynitrilase und konnte neben anderen Autoren zeigen, daß dieses Enzym in der Pflanzenwelt weit verbreitet ist (1).

E.NORDEFELDT (2) untersuchte die Rolle des Emulsins bei der Einstellung des Oxynitrilgleichgewichtes. Auf verschiedenen Reinigungswegen erhielt er Fermentpräparate, die kein Eiweiß und nur wenig Kohlehydrate enthalten sollten. Auf Grund von Diffusionsversuchen ermittelte er als Molekulargewicht den Wert 5000.

H.ALBERS und Mitarbeiter kamen zu saubereren Enzympräparaten und konnten zeigen, daß die Anfangsgeschwindigkeit der asymmetrischen Cyanhydrinsynthese, festgelegt durch den nach 5 Minuten bestimmten Drehwinkel einer Oxynitrilprobe unter Standardbedingungen proportional der Fermentkonzentration ist (3).

U.BENTHIN (4) gelang es in verschiedenen Reinigungsverfahren unter Verwendung von Ecteola-Cellulose, die das eigentliche Enzym verunreinigende β -Glukosidase weitgehend abzutrennen. Er konnte ferner nachweisen, daß die Oxynitrilase zur Gruppe der Flavoproteine gehört und vermutete als prosthetische Gruppe Flavinmononucleotid.

E.ESCHENHOF schloß dem vorgenannten Reinigungsweg eine Gelfiltration an Sephadex an und gelangte auf diese Art zwar zu hochaktiven Enzympräparaten, die sich jedoch

weder in der Ultrazentrifuge noch in der Tiselius-Elektrophorese als rein erwiesen (5).

W.BECKER (6) konnte im Verlauf seiner umfangreichen Arbeiten das Enzym rein und kristallin darstellen. Zur Kennzeichnung seiner Stereospezifität nannte er es D-Oxynitrilase. Der Einheitlichkeitsbeweis wurde seinerzeit nach drei verschiedenen Verfahren geführt: - Sedimentation in der Ultrazentrifuge, Tiselius-Elektrophorese und Agar-Diffusionstests mit von Kaninchen gewonnenen Antiseren nach Ouchterlony. Ferner konnte er zeigen, daß das Ferment wohl zur Gruppe der Flavoproteine gehört, als Coenzym aber Flavinadenindinucleotid besitzt. Es gelang mit Säuren in Ammoniumsulfatlösung das Enzym reversibel in Co- und Apoenzym zu spalten, ein Molekulargewicht größerer Wahrscheinlichkeit anzugeben, molare Extinktionskoeffizienten für charakteristische Wellenlängen des Absorptionsspektrums zu ermitteln und sich mit kinetischen Problemen der asymmetrischen Cyanhydrinsynthese erfolgreich auseinanderzusetzen.

In Fortführung beschäftigte ich mich im Rahmen meiner Diplomarbeit mit Möglichkeiten der präparativen Gewinnung von resyntheseaktivem Apoprotein und seiner Stabilisierung, Ermittlung von optimalen Resynthesebedingungen mit einer Maximalausbeute von 75% aktivem, resynthetisiertem Ferment und ersten, orientierenden Versuchen zur Formbestimmung der Enzymmolekel mittels Röntgenkleinwinkelstreuung.

In der folgenden Arbeit kann gezeigt werden, daß die bisher als einheitlich angesehene Mandel-D-Oxynitrilase (E.C. 4.1.2.10) in Wirklichkeit ein Gemisch von drei Iso-Enzymen darstellt. Es werden ein präparatives Verfahren zu ihrer Gewinnung und einige charakteristische Eigenschaften (prothetische Gruppe, Absorptionsspektren, Aktivität, immunologisches Verhalten, elektrophoretische Beweglichkeit in verschiedenen Medien, isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht, Aggregationsverhältnisse, in zwei Fällen die Molekülform und -abmessungen, qualitative und quantitative Aminosäureanalyse) angegeben.

Darstellung von reinster Mandel-D-Oxynitrilase

Die in der Folge aufgezeigten Untersuchungen an Mandel-D-Oxynitrilase machten es notwendig, wesentlich größere Mengen an hochreinem Enzym herzustellen, als es bisher der Fall war.

Das bestehende Reinigungsverfahren: (6)

Auszug von Mandelmehl mit verdünntem Ammoniak von p_H 7,5 -

Fällung der Hauptbegleitstoffe durch p_H - Verschiebung auf p_H 5 mittels Eisessig -

Fällung des Rohferments mit Alkohol -

Trennung des Rohferments an Ecteola-Celluloseaustauscher*) in beta-Glukosidase und Oxynitrilase -

Feinstreinigung dieser Oxynitrilase durch mehrmaligen Lauf an Sephadex G-100**)

wurde seinem Gang nach im wesentlichen beibehalten, sein Umfang stark vergrößert.

Die Feinstreinigung erfolgte nun an Großsäulen von 230 cm Länge bei 40 mm Durchmesser und erlaubte bei gleicher Trenngüte fünf bis siebenfache Auftragsmengen des bisherigen Vorganges.

Darüber hinaus wurde in zweifacher Hinsicht modifiziert.

Der Puffer- p_H wurde von 4,9 auf 7,5 verlegt, da sich das Enzym in leicht basischem Gebiet als wesentlich stabiler erwies. Zum anderen wurde eine neuartige Konzentrationsmethode für verdünnte Enzymlösungen ausgearbeitet, die das bisherige zeitraubende Fällungsverfahren des Ferments mit Ammonsulfat nach dem Passieren der Säule umgeht.

Sie besteht einfach darin, daß man die verdünnte Oxynitrilase-Lösung mittels einer Pumpe langsam von unten her in eine Schicht trockenes Sephadex G-25 coarse**) pumpt. Lösungsmittel- und Pufferbestandteile können auf Grund ihrer

*) Hersteller: C.Schleicher & Schüll, Dassel

**) Hersteller: Deutsche Pharmacia, Frankfurt/Main

Dimensionen ungehindert in das Gelgerüst eindiffundieren, während die großvolumigen Enzymmoleküle quasi im Ausschlußvolumen laufen. Auf diese Weise wird bei konstantem p_H und gleichbleibender Tonenstärke eingengt. Nach Eintragung der Enzymlösung pumpt man reinen Puffer nach. Mit dem stetig nachfolgenden Puffer wächst die Höhe des Gelbettes durch Quellung immer mehr, das Enzym sammelt sich in dem immer schmaler werdenden Grenzbereich zwischen "naß und trocken", tritt nach Erschöpfung der Sephadex-Kapazität in schmäler, hochkonzentrierter Zone aus und wird hier zur Weiterverarbeitung entnommen^{*)}.

Auf diese Weise ist es möglich, in sinnvoll koordinierten Teilabläufen pro Monat mehr als 1g disc-elektrophoretisch reine Mandel-D-Oxynitrilase zu erstellen.

3. Mandel-D-Oxynitrilase - Isoenzyme

3. 1 Darstellung

Das nach 2. gewonnene Enzym erweist sich im Ouchterlony- und Scheidegger-Test (7) als einheitlich. Disc-Elektrophorese in Acrylamidgel (28) bringt nachstehendes Bild,



Abb.1 Disc-Elektrophorese von hochreiner Mandel-D-Oxynitrilase

dessen Struktur sich auch nach nochmaligem Trennungslauf an Sephadex G-100 nicht weiter ändert. Optische Vergrößerung und Abtastung dieser Disc-Trennung mittels Densitometer gaben jedoch Anlaß zur Vermutung, daß das bisher als

^{*)} Einzelheiten siehe unter 1., experimenteller Teil

einheitlich angesehene Produkt aus mehreren Komponenten bestehen müsse. Zu ihrer Isolierung wurden zunächst zwei Wege beschritten; präparative Disc-Elektrophorese einerseits und Abtrennung an geeigneten Celluloseaustauschern. Solche Celluloseaustauscher eignen sich besonders zur Reinigung und Abtrennung von Proteinen, da sie neben wenigen, eng lokalisierten Bereichen mit reiner elektrostatischer Ladung eine breite Matrix von Hydroxylgruppen besitzen. Diese Matrix verleiht dem Austauscher im Vergleich zum vernetzten Kunstharztypus zusätzlich zwei Effekte. Einmal bedingen gerade die nichtionischen Wechselwirkungen zwischen Matrix und Polyelektrolyt seine hohe Selektivität. Zum anderen wirkt die hohe Zahl an Hydroxylgruppen stabilisierend auf die native Struktur des Proteins während des Trennvorganges (8).

Nach umfangreichen Vorversuchen gelang es, wenn auch zunächst in unvollständiger Weise, das Ferment Mandel-D-Oxynitrilase an Celluloseaustauscher vom Typ Whatman DE 32 mittels Gradientenelution (Konzentrationsgradient) in drei unterschiedliche Anteile aufzutrennen.

Zur Schaffung reproduzierbarer Trennverhältnisse war es notwendig, zumindest am Säuleneingang den zeitlichen Konzentrationsverlauf des Gradienten zu bestimmen.

Diese Aufgabe ließ sich mittels einer Leitfähigkeitszelle mit nachgeschalteter hochempfindlicher Messbrücke^{*)} lösen.

Damit ergab sich für die weitere Auftrennung der Mandel-D-Oxynitrilase nachstehende Versuchsanordnung (Abb.2):

Auf die Säule L wird ein empirisch ermittelter, optimaler Betrag an Enzym aufgebracht. Pu_2 enthält konzentrierten - 0,15 M - Sörensen-Puffer, Pu_1 eine endliche Menge gleichen Puffertyps in - 0,01 M - Konzentration. Diese Menge verdünnter Puffer bestimmt als Parameter bei Betrieb der Pum-

*) Zellenspannung 18V~, gleichgerichteter Brückenquerstrom wurde einem Hartmann & Braun-Schreiber, Typ K 65 Z 5-778 angepaßt. Meßbereich 1mV auf 30 cm Registrierbreite

pe P den zeitlichen Konzentrationsanstieg in der Säule, der von der Leitfähigkeitszelle b über die Brücke Vb vom Schreiber S₁ registriert wird. Ein auf P folgendes

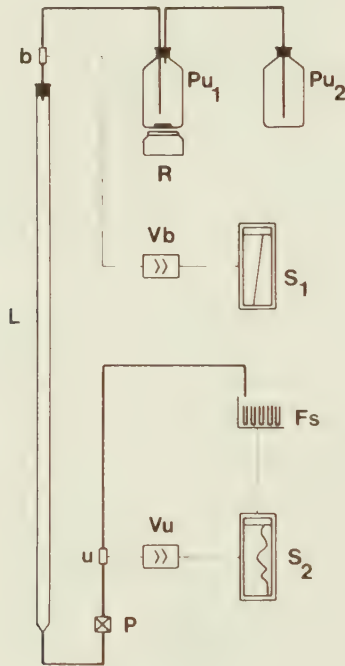


Abb.2 Blockschema der Gradiententrennung von D-Oxynitrilase

Durchflußphotometer Vu kennzeichnet über den Schreiber S₂ den Trennungsverlauf. Das Eluat wird in einem Fraktionssammler Fs aufgefangen *).

*) Einzelheiten siehe unter 2., experimenteller Teil

Wie aus Abb.3 ersichtlich, verbessert sich die Trennung der einzelnen Komponenten mit steigenden Mengen an verdünntem - 0,01 M - Puffer in Pu_1 .

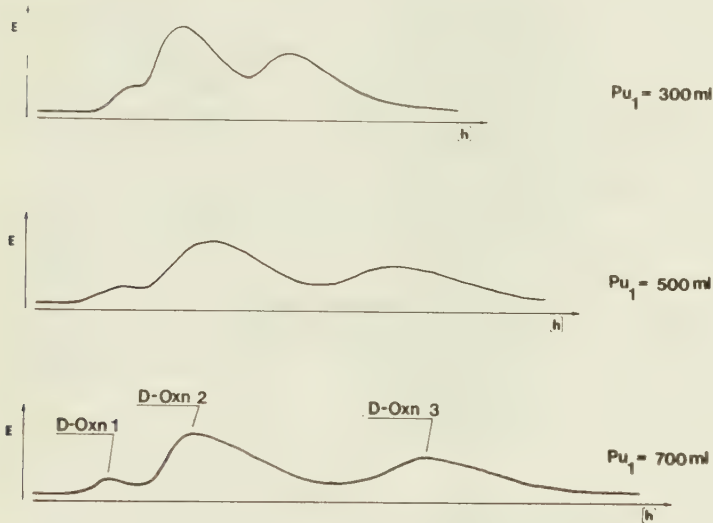


Abb.3 Mandel-D-Oxynitrilase
Trennungsverhältnisse bei verschiedenen
Konzentrationsgradienten

Sie wurde in der Weise bestimmt, daß man einen solchen Gesamtverlauf in 36 Fraktionen unterteilte und diese alle disc-elektrophoretisch untersuchte. Optimale Trennungsbedingungen ergaben sich bei Vorlage von 700 ml - 0,01 M - Sörensen-Puffer in Pu_1 . Eine Übersicht des genauen Schnitts zeigt die Montage in Abb.4.

Um absolut reine Komponenten für anschließende Untersuchungen zu bekommen, wurden die ausgewählten Bereiche mit Absicht sehr eng gewählt.

Die abgetrennten Produkte waren allesamt gelb gefärbt, besaßen im Gebiet von 300 - 600 m μ das gleiche Oxynitrilase-spektrum (6), zeigten identische Fällbarkeitseigenschaften und Beständigkeit und fluoreszierten im UV-Licht nicht.

M-D-OxN 1 ist zu 7%, M-D-OxN 2 zu 53% und M-D-OxN 3 zu 40% in dem Komponentengemisch vorhanden.

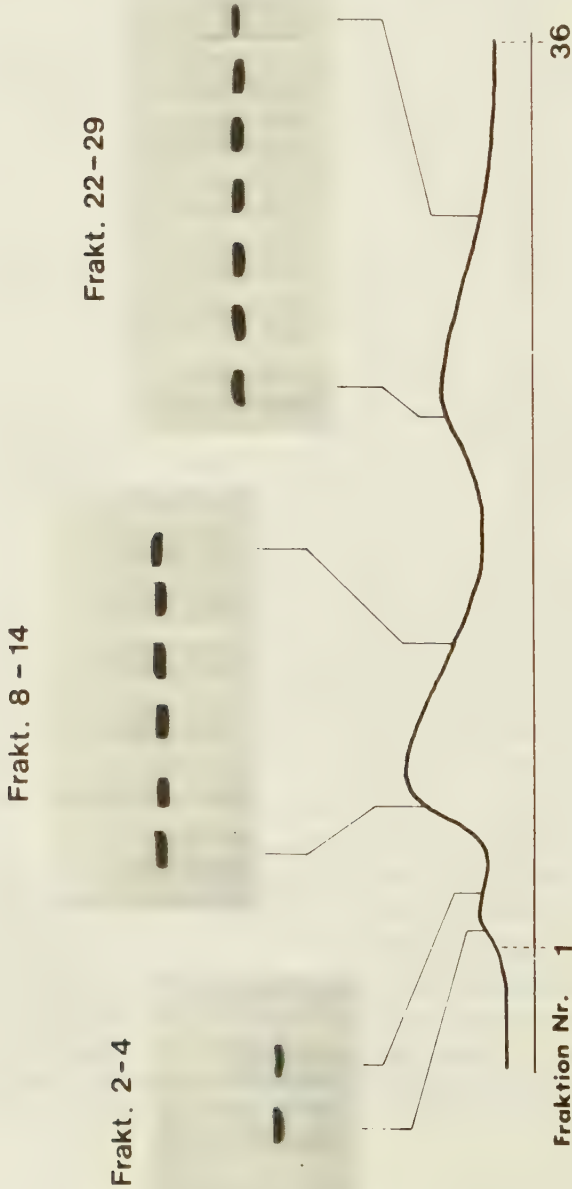


Abb. 4 Gradiententrennung von Mandel-D-Oxynitrilase an Whatman DE 32 unter optimalen Bedingungen

3.2 Charakterisierung der Komponenten

Es ergab sich automatisch die Frage: Stellen diese Produkte Untereinheiten dar oder sind sie selbst Enzyme?

3.2.1 Eine Charakterisierung solcher Substanzen erfolgt meist durch eine Aktivitätsmessung. Die unter 2. gewonnene, hochreine Oxynitrilase katalysiert je nach Bedingungen die Synthese Aldehyd + Blausäure zu D-(+)-Cyanhydrin oder dessen Spaltung.

Auf dieser Grundlage werden zur Aktivitätsbestimmung folgende Standard-Tests durchgeführt:

a) Spalttest

Hier wird unter Standardbedingungen D-(+)-Mandelsäurenitril mit Hilfe von Oxynitrilase gespalten und der Zerfall durch Absorptionsmessung im Gebiet der $C=O$ - Bande verfolgt.

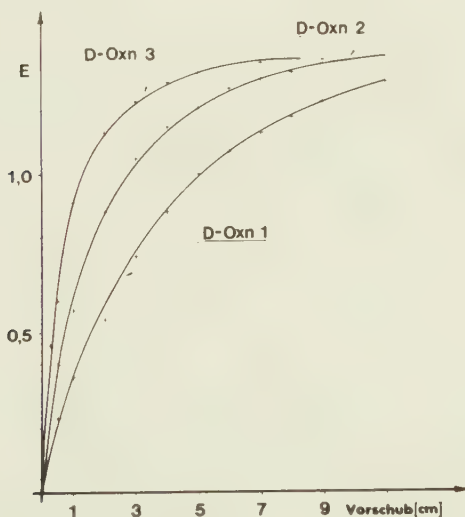


Abb. 5 Spalttest

b) Drehtest (29)

Er gibt die zeitliche Drehwinkeländerung bei der asym. Synthese von D-(+)-Mandelsäurenitril aus Benzaldehyd und Blausäure unter standardisierten Bedingungen an.



Abb.6 Drehtest

----- = gewöhnliche Oxynitrilase

Nach Abb.5 und 6 erweisen sich alle drei gradientenge-trennten Typen - wenn auch unterschiedlich - als deut-lich aktiv.

Vergleicht man die Aktivität des gewöhnlichen, hochreinen Enzyms in Abb.6 mit denen der drei abgetrennten Kompo-nenten, so ergibt sich, gemessen am 4'-Drehwert, für:

M-D-OxN 1 eine Minderaktivität von 60%

M-D-OxN 2 eine Minderaktivität von 30%

M-D-OxN 3 eine Mehraktivität von 5%

Der Spalttest erbringt ähnliche Verhältnisse. Damit fand der gehegte Verdacht auf ein Vorliegen von Isoenzymen seine erste Bestätigung. Zur weiteren Sicherung wurden zunächst immunologische Untersuchungen angestellt.

3.2.2 Geldiffusion nach OUCHTERLONY (7) zeigte - wieder im Vergleich zu der unter 2. gewonnenen M-D-Oxynitrilase -, daß alle Komponenten eine untereinander gleiche Anzahl von immunologisch determinanten Stellen enthalten.

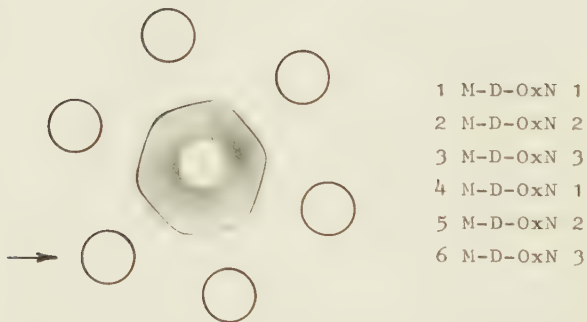
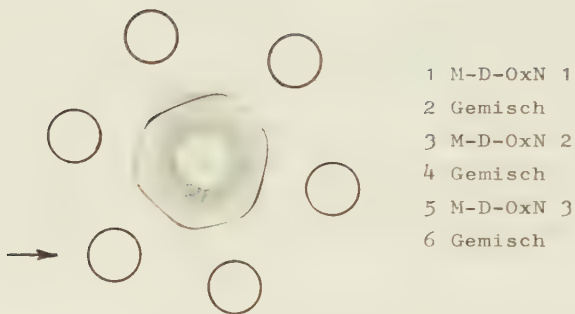


Abb.7/8: Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY
Die Auftragsstellen werden von der Pfeilung $\hat{=}$ 1, im Uhrzeigersinn durchlaufen.

Die Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER (7) zeigt deutlich die unterschiedliche Beweglichkeit der Komponenten im elektrischen Feld (Abb.9).

Das Gemisch selbst läßt sich nach diesem Verfahren nicht auftrennen.

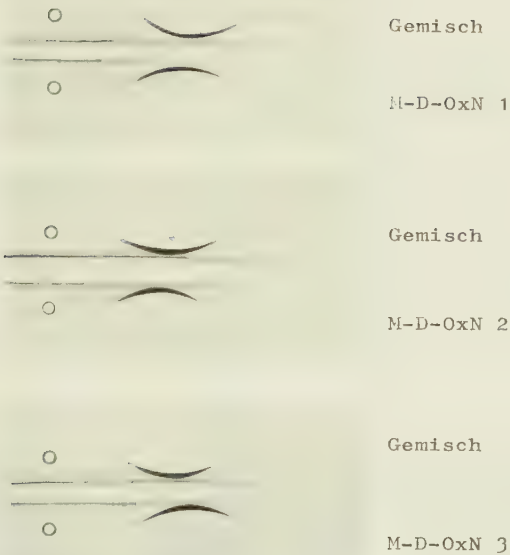
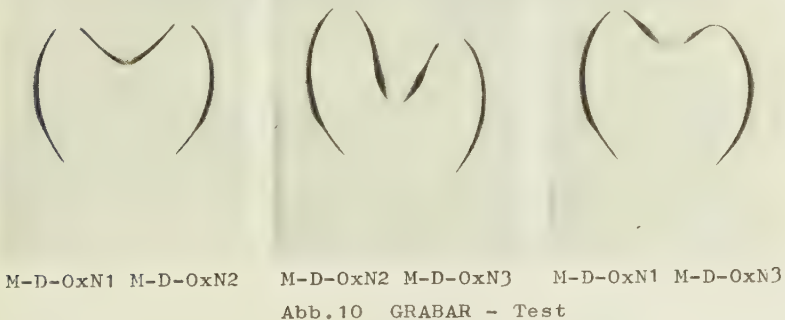


Abb.9 Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER

Eine Bestätigung der bisher gefundenen Verhältnisse - gleiche Anzahl immunologisch determinanter Stellen und unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit - ergibt sich im GRABAR - Test (9).



Wenn nun diese drei, unter 3.1 abgetrennten Komponenten, Iso-Enzyme darstellen, die bei gleichen Coenzymen untereinander geringe Unterschiede in der Bausteinfolge des Proteingerüsts besitzen, so erhebt sich die Frage: "Gehen diese Abweichungen immunologisch durch", d.h. sind sie so gravierend, daß sie die Bildung verschiedener Antikörper im Organismus bedingen?

Zur Klärung wurden Ratten mit disc-elektrophoretisch reinen Komponenten M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3 immunisiert.

Mit den so gewonnenen Antiseren führte man Kreuzreaktionen - OUCHTERLONY-Tests auf Objektträgern - durch.

Abb.11 veranschaulicht die Verhältnisse



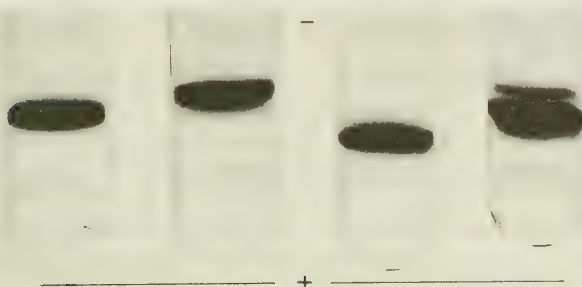
Abb.11 Immunologische Kreuz-Reaktionen
(OUCHTERLONY - Test)
röm. Ziffern: Antiseren
arab.Ziffern: Iso-Enzyme

Es ergibt sich in jedem Falle die gleiche Anzahl immuno-
logisch determinanter Stellen.

Diese Ergebnisse entsprechen der PAULING'schen Theorie
über die Bildung von Antikörpern, die die Faltung des
Antikörpers, und nicht seine Aminosäure-Bausteinfolge,
als bestimmendes Kriterium für die Entstehung eines
komplementär gefalteten gamma-Globulins ansieht ((31),
vgl. insbesondere 3.3.3.2).

3.2.3 In der Disc-Elektrophorese summieren sich zwei Effekte,
einmal die Diffusion der Proteinmoleküle durch enge Poren
und zum anderen ihre Bewegung im elektrischen Feld.

Hier treten die Unterschiede zwischen den einzelnen Kom-
ponenten besonders augenfällig zu Tage.



M-D-OxN 1 M-D-OxN 2 M-D-OxN 3 Gemisch

Abb.12 Disc-Elektrophorese

Einen Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeiten
der drei gradientengetrennten Komponenten in SCHEIDEGGER-
und Disc-Elektrophorese gibt nachstehende Abbildung
wieder.

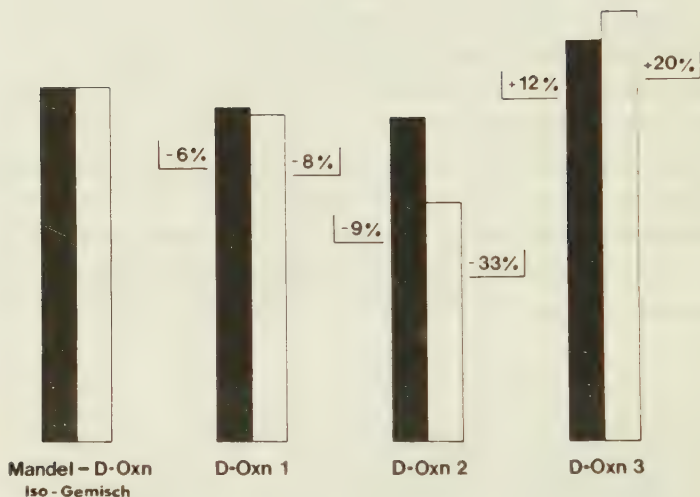


Abb.13 Elektrophoretische Beweglichkeit
schwarzes Feld: Scheidegger - E.
weißes Feld: Disc - E.

3.2.4 Verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit in Medien wie Agar oder Polyacrylamid-Gel muß aber, wenigstens teilweise, auf Unterschieden in der nach außen auftretenden Gesamtladung der betreffenden Enzymmoleküle beruhen.

Tatsächlich kann nach der Elektrofokussiermethode^{*)} (10) entlang eines p_{II} - Gradienten, der auf 30 cm Säulenlänge ein Gefälle von einer p_{II} - Einheit (p_{II} 4-5) aufweist, der jeweilige isoelektrische Punkt der drei Komponenten zu

$$I = 4,430 \text{ } p_H$$

$$II = 4,460 \text{ } p_{II}$$

$$III = 4,415 \text{ } p_H$$

bestimmt werden.

^{*)} Entwicklung des Verfahrens und der zugehörigen Apparatur: LKB-Produkte, Stockholm

3.2.5 Absorptionsspektren von M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3.

Hochreine Mandel-D-Oxynitrilase besitzt Maxima bei 275,390 und 460 m μ (6).

Eine deutliche Schulter findet sich im Bereich 475 - 485 m μ , eine schwach ausgeprägte bei 375 - 385 m μ .

Die Minima liegen bei 248,320 und 415 m μ . (Gemessen in 0,033 M Phosphat-Puffer p_H 7,0)

Vermißt man nun die drei Komponenten im sichtbaren Bereich^{*)}, so ergibt sich sowohl eine völlige Analogie der drei Typen untereinander, als auch zum Spektrum der hochreinen Mandel-D-Oxynitrilase.

Bei einer Konzentration von 10 mg/ml beträgt

$$\epsilon_{460 \text{ m}\mu} = 1,500$$

$$\epsilon_{390 \text{ m}\mu} = 1,654$$

für alle drei Typen. Das von BECKER (6) gefundene Verhältnis $\epsilon_{390 \text{ m}\mu} / \epsilon_{460 \text{ m}\mu} = 1,1$ bestätigt sich vollauf.

Im UV - Bereich (Maximum 275 m μ) unterscheiden sich die drei Komponenten geringfügig:

$$\epsilon_{275 \text{ m}\mu} = 14,14 \text{ für M-D-OxN 1}$$

$$\epsilon_{275 \text{ m}\mu} = 13,93 \text{ für M-D-OxN 2}$$

$$\epsilon_{275 \text{ m}\mu} = 14,22 \text{ für M-D-OxN 3}$$

(bei einer Konzentration von 10 mg/ml)

Daraus errechnet sich das Verhältnis $\epsilon_{275 \text{ m}\mu} / \epsilon_{460 \text{ m}\mu}$ für

$$\text{M-D-OxN 1} = 9,43$$

$$\text{M-D-OxN 2} = 9,29$$

$$\text{M-D-OxN 3} = 9,48$$

Für die starke Absorption im UV - Bereich sind vorwiegend Tyrosin und Tryptophan verantwortlich.

*) Messgeräte: CARY - 15 - Spektralphotometer für registrierende Messungen

ZEISS PMQ II mit 100%-Automatik für Absolutbestimmungen

Wenn auch hier nur Differenzen von 1,5% (M-D-OxN 1) bzw. 1,8% (M-D-OxN 3) in Bezug auf M-D-OxN 2 vorliegen, so stützt doch ein anderer experimenteller Befund dieses Ergebnis.

Nach quantitativer Aminosäureanalyse (siehe 3.3.3.2) besitzt M-D-OxN 3 den höchsten Gehalt an Tyrosin (3,9%) M-D-OxN 2 dagegen nur 1,0%; M-D-OxN 1 liegt dazwischen (2,3%).

Faßt man die unter 2.2 aufgeführten Untersuchungsergebnisse zusammen, so stellen scheinbar die drei genannten Komponenten Isomere dar.

Die Mandel-D-Oxynitrilase erscheint damit als ein Iso-Enzym-Gemisch, dessen Gesamtaktivität und Eigenschaften sich aus den Teilkriterien der einzelnen Isomeren zusammensetzt.

3.3 Aufbau und Strukturunterschiede der einzelnen Isoenzyme

Mit der Erkenntnis, daß die bisher als einheitlich ange-sehene Mandel-D-Oxynitrilase aus drei Iso-Enzymen besteht, erwächst die Aufgabe, die einzelnen Komponenten näher zu charakterisieren.

3.3.1 Molekulargewicht

Nach WHITACKER, ANDREWS u.a. (11) ergibt sich beim Lauf von Proteinen an genau äquilibrierten Sephadex - Säulen eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus des Molgewichts und dem Elutionsvolumen s bzw. dem Quotienten aus Elutions- und Ausschlußvolumen s/s_0 .

Vom Experimentellen her wurde durch Einsatz von synchron-motorgetriebenen Pumpen am Ein- und Ausgang einer Sephadex G-150 - Säule, auf $1 \pm 0,1^\circ\text{C}$ temperiert, ein Höchstmaß an konstantem Durchsatz verwirklicht.

Trotzdem ergaben bereits die Eichsubstanzen definierten Molgewichts - Ribonuclease, Trypsin, Human-Albumin und Transferrin - Abweichungen von der nach Literatur postulierten Gerade.

Der Grund dafür liegt wohl nicht bei unreinen Eichsubstanzen oder in experimentellen Unzulänglichkeiten. Vielmehr basieren diese Abweichungen wohl auf der physikalischen Tatsache, daß streng genommen nur Moleküle gleicher Gestalt, aber unterschiedlicher Größe auf einer solchen, definierten Gerade liegen können.

Proteine besitzen nun aber in ihrer Molekülgestalt mannigfache Formen, die sich in einem ganzen Spektrum von geometrisch nicht zuordnungsbaaren bis zu Kugel - Formen erstrecken (12).

Ein beispielsweise rotationselliptischer Körper benötigt bei der Diffusion im Vergleich mit einer gleichvolumigen, kugelförmigen Partikel "größere Poren", d.h. er wird auf der Säule wesentlich schneller wandern als die Kugel. Damit erbringen also theoretisch Proteine gleichen Molekulargewichts, aber unterschiedlicher Form verschiedene "Molgewichte".

Aus diesem Grunde ist eine genaue Molekulargewichtsbestimmung durch Diffusionsmessung offenbar auch aus theoretischen Gründen nicht möglich.

Begnügt man sich hingegen mit einer Abschätzung - MG'^* - so ergeben sich bei Auftrag der unter 2.1 gewonnenen drei Komponenten auf eine geeichte Säule untereinander geringe, aber durchaus reproduzierbare Unterschiede.

Die einzelnen "scheinbaren Molekulargewichte" betragen bei:

M-D-OxN 1 MG'^* = 67.800

M-D-OxN 2 MG'^* = 66.000

M-D-OxN 3 MG'^* = 66.100

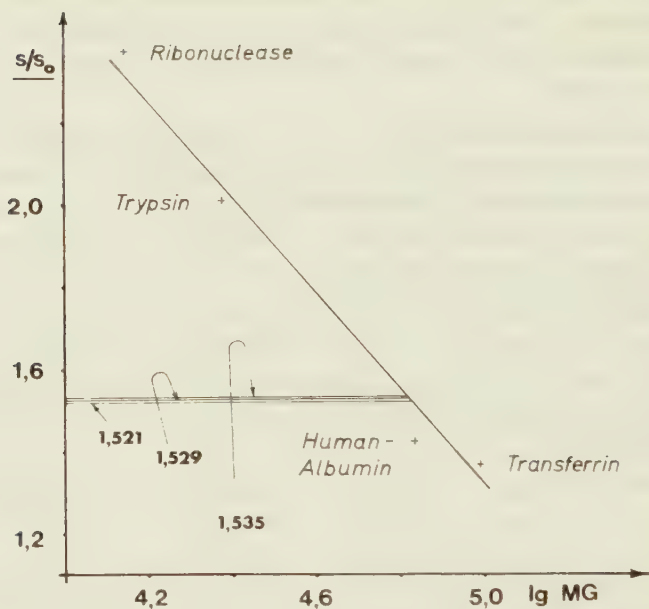


Abb.14 "Molekulargewichte*" durch Gel-Diffusionsmessungen

3.3.2 Papierchromatographische Untersuchungen zur Bestimmung der Coenzyme von M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3

Sind geringe molekulare Strukturunterschiede bei den einzelnen Oxynitrilase-Komponenten vorhanden, so können sie einmal in den einzelnen Coenzymen begründet sein, zum anderen beim Proteinanteil des Ferments liegen.

Zur Klärung des einen Punktes wurden die drei Komponenten bei Zimmertemperatur sauer gespalten, das denaturierte Protein abzentrifugiert und die überstehenden Lösungen papierchromatographisch untersucht.

Es zeigt sich, daß alle drei Proben nur FAD enthalten.

Zur zusätzlichen Sicherung dieses Ergebnisses wurden noch durch Substituenten abgewandelte FAD - Typen^{*)} unter analogen Bedingungen chromatographiert.

	<u>R_f</u>
FAD	0,43
3-Methyl-FAD	0,55
3-Carboxy-FAD	0,52
2-Morpholino-FAD	0,46
FGD	0,45
FID	0,49

Hier zeigt sich, daß schon geringe Abänderungen, besonders am Isoalloxazinteil des Coenzyms FAD, erhebliche Änderungen des R_f - Wertes bedingen.

Damit dürfte die Feststellung gleicher Coenzyme bei Mandel-D-Oxn 1, D-Oxn 2 und D-Oxn 3 als gesichert gelten.

3.3 Untersuchungen am Protein-Teil

Das Apoprotein des M-D-Oxynitrilase - Isogemischs, das durch mehrmalige Spaltung mit ammoniumsulfathaltiger 2 N Schwefelsäure in Gegenwart von 3 M Kaliumbromid gewonnen wird (13), erweist sich als eine, vor allem gegen geringste Temperaturerhöhungen, sehr empfindliche Substanz. Es war sehr schwierig, z.B. in parallel verlaufenden Spaltungen immer Verbindungen mit genau gleichen Eigenschaften zu erhalten.

Die wesentlichen Merkmale des Mandel-D-Oxynitrilase - Apoproteins seien kurz aufgeführt:

- a) Es läßt sich mit FAD in max. 75%-iger Ausbeute in D-Oxynitrilase umwandeln^{**)} .
- b) Die Aktivität der frisch resynthetisierten Oxynitrilase beträgt 50% des Ausgangswertes, erreicht diesen aber voll bei Lagerung im ausgefällten Zustand unter 0 Grad C. über eine gewisse Zeit^{**)} .

^{*)} Ich danke Herrn Prof.Dr.P.HEMMERICH, Basel für die frdl. Überlassung dieser Substanzen

^{**)} siehe Diplomarbeit Aschhoff 1966

- c) Es läßt sich im ausgefällten Zustand (mit Ammonsulfat) bei 0 Grad C beliebig lange lagern, ohne seine Resynthesefähigkeit einzubüßen.
- d) Es enthält stets einen, während der Spaltoperation gebildeten Anteil von nativem, aber aggregiertem, resyntheseinaktivem Apoprotein.
- e) An 100cm langen, auf 0°C temperierten Sephadex - G-150 Säulen, läßt sich aggregiertes und nicht aggregiertes Apoprotein trennen.
- f) Diffusionsmessungen nach 3.3.1 bei 0°C ergeben für das Apoprotein ein wesentlich größeres scheinbares Molekulargewicht als beim Holoenzym 83.000 gegenüber 67.000 !*)
- g) Eine monodisperse, aggregatfreie Lösung von D-Oxynitrilase - Apoprotein läßt sich in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer p_H 8 herstellen, der 0,4 M an Ammoniumsulfat ist.
- h) Die Zurückdrängung der Aggregation durch Zusatz von Ammonsulfat ist reversibel**).

Mit der Auffindung geeigneter Bedingungen zur Herstellung monodisperser und einheitlicher D-Oxynitrilase - Apoenzymlösungen konnten nun die eigentlichen Untersuchungen der einzelnen, unter 3.1 abgetrennten Komponenten weitergehen.

Aminosäure - Analysen

3.3.3.1 Beim Vorhandensein gleicher Cofermente in den einzelnen Komponenten müssen ihre Strukturunterschiede, die zu abweichendem Verhalten bei einigen physikalischen Messungen führen, im Aufbau der einzelnen Apoproteine liegen.

Bevor man die Apoproteine von M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3 auf diese Frage hin weiter untersuchte, wurden am Apoprotein aus Oxynitrilase-Gemisch, das bequem und in größeren Mengen zugänglich ist, orientierende Operationen vorgenommen.

Mit Sicht auf eine qualitative und quantitative Aminosäureanalyse waren zunächst Bedingungen aufzufinden, die eine

*) siehe 3.3.1

**) siehe unter 11., experimenteller Teil (Apo M-D-OxN 2)

möglichst schonende Hydrolyse des Proteinkörpers gewährleistet. Der Aufschluß mit 6 N HCl unter Stickstoff, welcher von BECKER u.a. (6c) angewendet worden war, wurde wegen zu starker Huminbildung von vornherein verworfen.

Wesentlich günstigere Ergebnisse erzielt man bei einem Verfahren, das erstmals bei der Hydrolyse von peptidartig aufgebauten Mutterkornalkaloiden durch PÖHM (14) Anwendung fand.

Es basiert auf der Beobachtung, daß heterogen katalysierte Reaktionen schonender verlaufen und zu reineren Produkten führen, als die in homogener Phase vollzogenen Umsetzungen. Man arbeitet mit stark saurem Kationenaustauscher (15) als "fester Säure". Als Lösungsmittel fungiert 80% iges Äthanol, die Reaktionszeit beträgt 10 Stunden bei 95° unter Stickstoff.

Hier wurde die Huminbildung faktisch ganz in den Hintergrund gedrängt und es ergeben sich beim Apoprotein, hochreiner Mandel-D-Oxynitrilase dünnschichtchromatographisch 21 verschiedene, davon zwei nicht genau identifizierbare, Aminosäuren (Abb.15).



Abb.15 Dünnschichtchromatogramm eines Hydrolysats von Mandel-D-OxN-Apoprotein mit saurem Ionenaustauscher

B-Laufrichtung: 78% Phenol in Wasser

A-Laufrichtung: But: HAc:H₂O=4:1:1

Die Auswertung (16,17) ergab Leucin 1, Isoleucin 2, Phenylalanin 3, Methionin 4, Valin 5, Tyrosin 6, Alanin 7, Prolin 8, Threonin 10, Glycin 11, Methioninoxid 12, Glutaminsäure 13, Serin 14, Asparaginsäure 15, Arginin 16, Histidin 17, Lysin 18, Cystein 19, Spuren Tryptophan 9 und zwei nicht identifizierbare Körper X und Y.

Indolkörper werden in diesem sauren Aufschluß allerdings weitgehend zerstört (14).

Trotzdem gelang es, auf dem Weg über einen basischen Aufschluß mit gesättigter Lösung von Bariumhydroxid (18), im Oxynitrilase-Apoprotein auch noch Tryptophan einwandfrei aufzufinden (Abb.16).

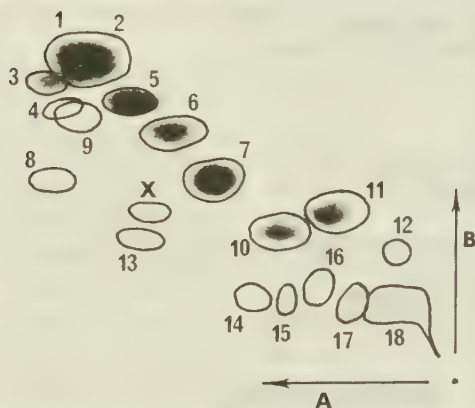


Abb.16 Dünnschichtchromatogramm eines Hydrolysats von Mandel-D-OxN-Apoprotein mit Bariumhydroxid

B-Laufrichtung: 78% Phenol in Wasser

A-Laufrichtung: But: HAc:H₂O=4:1:1

Leucin 1, Isoleucin 2, Phenylalanin 3, Methionin 4, Valin 5, Tyrosin 6, Alanin 7, Prolin 8, Tryptophan 9, Glycin 10, Glutaminsäure 11, Asparaginsäure 12, Methioninoxid 13, Histidin 14, Arginin 15, Serin 16, Lysin 17, Cystein 18.

Zur Umsetzung gelangten jeweils 1 mg salzfreies, gefriergetrocknetes Apoprotein.

In zahlreichen Parallelaufschlüssen wurde die Fehlerbreite der v.g. sauren und basischen Hydrolyseverfahren bestimmt. Erst dann begann ich mit der sauren Spaltung der Apoproteine M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3.

3.3.3.2 Allerdings erfolgte jetzt an Stelle der qualitativen Beurteilung eine Ermittlung der quantitativen Aminosäure-Zusammensetzung im Nanomolalanalyzer (automatisches Verfahren) nach KIRSTEN (19). Die wirksame Säulenlänge betrug 120cm bei 0,5mm Innendurchmesser.

Es ergaben sich folgende Werte: (Tabelle 1)

Aminosäure	D-OxN 1	D-OxN 2	D-OxN 3
Asparaginsäure	4,3%	10,1%	7,2%
Threonin	11,6%	4,5%	6,3%
Serin	21,2%	21,3%	16,9%
Glutaminsäure	0,2%	3,5%	5,9%
Prolin		5,6%	5,0%
Glycin	19,7%	17,3%	14,7%
Alanin	11,2%	8,1%	7,1%
Cystein	0,3%	0,5%	6,1%
Valin	2,3%	10,1%	5,1%
Methionin	4,9%	3,0%	2,5%
allo-Isoleucin	5,0%		
Isoleucin	5,1%	4,5%	4,1%
Leucin	6,2%	5,5%	7,8%
X (nicht identif.)	3,2%	3,0%	3,3%
Tyrosin	2,3%	1,0%	3,9%
Phenylalanin	2,5%	2,0%	4,1%

Tab.1 Anteile von sauren und neutralen Aminosäuren bei den unter 3.1 abgetrennten Komponenten

Eine graphische Darstellung dieser Verteilungsverhältnisse gibt Abb.17.

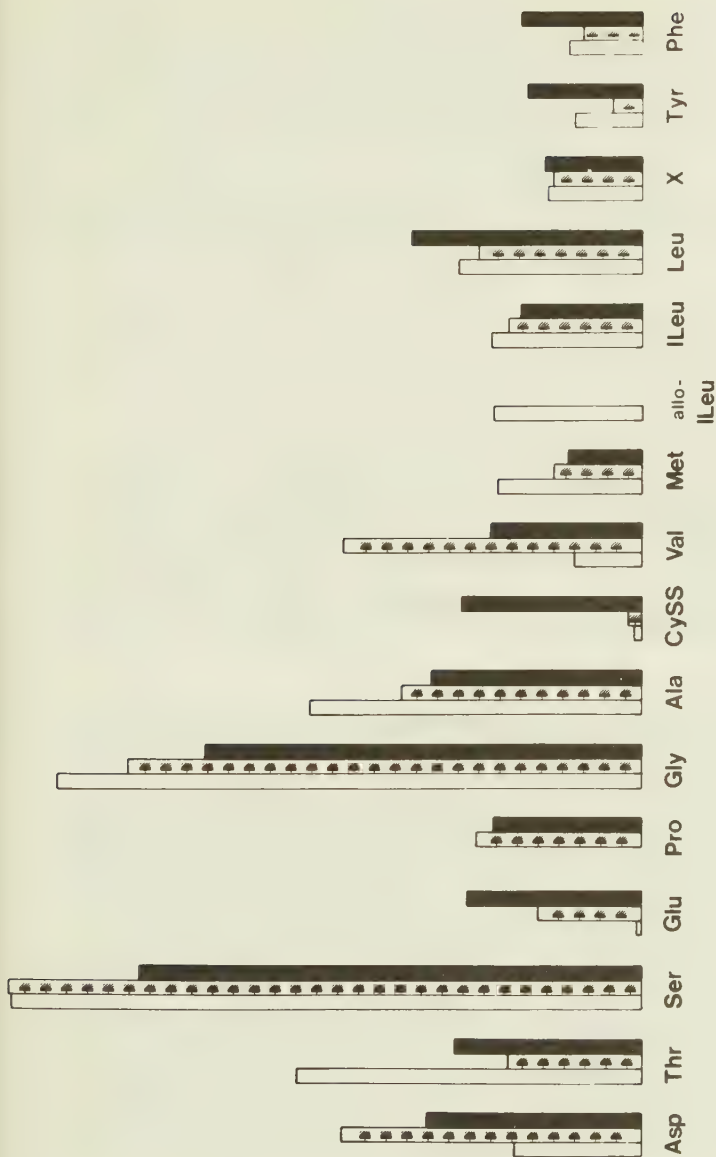


Abb. 17 saure und neutrale Aminosäuren bei
M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 u. M-D-OxN 3

M-D-OxN 1 enthält als einzige Komponente allo - Isoleucin und bringt, im Vergleich mit den Übrigen, die höchsten Gehalte an Threonin, Glycin, Alanin und Methionin. Bemerkenswert ist der geringe Anteil der sauren Aminosäuren und die Abwesenheit von Prolin.

M-D-OxN 2 fällt durch die vergleichsweise erhebliche Menge an Valin auf und besitzt die geringsten Anteile an Threonin, Tyrosin und Phenylalanin.

M-D-OxN 3 Bei ihm ist der hohe Gehalt von Cystein das augenfälligste, hervorzuhebende Kriterium.

Alle gemeinsam besitzen sie eine relativ große Menge Serin und Glycin.

Wenn auch über die Gesamtzusammensetzung der Aminosäurebestandteile - inclusive der basischen Typen - im Augenblick noch keine Angabe gemacht werden kann, so ergibt doch Tabelle 1 bzw. Abb.17 kleine, aber deutliche Unterschiede im Proteinbausteingefüge der einzelnen Oxynitri-lase - Komponenten.

3.3.4 Molekülform und Molekülabmessungen durch Bestimmungen der Röntgenkleinwinkelstreuung

Betrachtet man die Streuung einer elektromagnetischen Welle - Licht- oder Röntgenstrahlen -, so sind grob unterteilt drei charakteristische Fälle zu unterscheiden:

a) Wellenlänge $\gg$ größte Teilchendimension

Diese Verhältnisse liegen dem Molekulargewichtsbestimmungsverfahren durch Lichtstreuung (Wellenlänge $\sim 6000 \text{ \AA}$) zu Grunde (20). Die abgelenkten Sekundärwellen überlagern faktisch phasengleich, da sie wegen der kleinen Partikelgröße mit gleicher Phase von gleichen Punkten ausgehen. Die einzelnen Amplituden addieren sich, so daß unter der Voraussetzung extrem kleiner Konzentrationen, die Gesamt-

amplitude proportional der Masse der Teilchen ist.

b) Wellenlänge $\approx$ größte Teilchendimension

Vermißt man nach dem vorigen Verfahren sehr große Eiweißkörper - z.B. Tabakmosaikvirus, Zylinder von 2600 Å Länge - (21), so ist zu berücksichtigen, daß die von den einzelnen Volumenelementen ausgehenden gestreuten Wellen (z.B. A u. B bzw. A' u. B'), namentlich bei größeren Ablenkungswinkeln, nennenswerte Gangunterschiede besitzen (Abb.18).

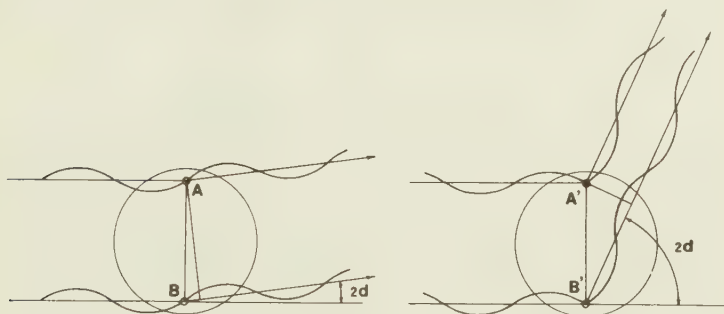


Abb.18 Streuungsverhältnisse an zwei Punktepaares unter den in b) gegebenen Bedingungen

Es kommt daher zu intramolekularen Interferenzerscheinungen, die mit zunehmendem Streuwinkel eine Schwächung der auftretenden Gesamtstreuung bedingen. Die Winkelabhängigkeit der Streuintensität ist dabei für größere Teilchen wesentlich stärker ausgeprägt (steiler abfallende Kurve in Abb.19) als für kleinere Moleküle (Kurve 1).

Bei extrem kleinen Konzentrationen liefert hier im Vergleich zu a) eine Extrapolation der Streuintensität gegen den Winkel 0 ein Maß für das Molekulargewicht.

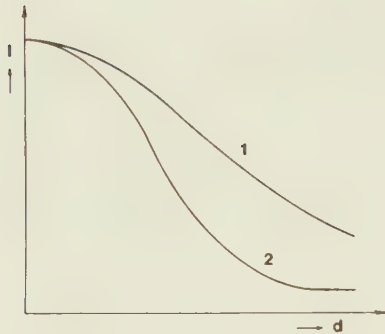


Abb.19 Streukurventypus für die unter b) gegebenen Bedingungen

c) Wellenlänge $\ll$ Teilchendimension

Diesen Fall hat man bei der Bestrahlung von Makromolekülen mit Röntgenlicht beispielsweise der Wellenlänge $1,54 \text{ \AA}$ (Cu-K α -Linie). Hier liefert Extrapolation gegen den Winkel 0 ebenfalls ein Maß für das Molekulargewicht. Absolut gilt:

(22)

$$M = 2,10 \cdot 10 \frac{I_0 \cdot r^2}{\sum \sum P_0 \cdot D \cdot c \cdot (z_1^+)^2}$$

darin bedeutet:

I_0 = auf Winkel 0 extrapolierte Intensität

$\sum \sum P_0$ = Intensität des über die ganze Fläche integrierten Primärstrahls

D = Präparatdicke in cm

c = Konzentration in g/cm³

r = Abstand Präparat-Registrierebene in cm

z_1^+ = $z_1 - v_1 \varrho_2$

z_1 = Molelektronen in 1 g gelöster Substanz

v_1 = partielles spezifisches Volumen der gelösten Substanz

ϱ_2 = Elektronendichte des Lösungsmittels - Molelektronen pro ccm

Für die Winkelabhängigkeit der Streuintensität ist prinzipiell das gleiche zu sagen wie unter b), nur erfolgt der Intensitätsabfall beim Übergang zu größeren Winkeln ungleich rascher als dort. (Vgl. Abb. 19/Seite 30) Bei einem Teilchen von beispielsweise 150 Å Durchmesser tritt eine wesentliche Streuung nur innerhalb eines Winkels von 0,5 Grad auf, ein Bereich, der die Bezeichnung Röntgenkleinwinkelstreuung rechtfertigt.

GUINIER (23) konnte nun zeigen, daß man für alle korpuskularen Teilchen in erster Näherung einen Gauss'schen Verlauf der Streuung annehmen darf.

$$I = I_0 \cdot e^{-KR^2 d^2}$$

I_0 = Streuung in Richtung $d = 0$

d = halber Ablenkswinkel

$$K = \frac{16 \pi^2}{3 \lambda^2}$$

"R", der sog. Streumassenradius, ist die Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat aller streuenden Elektronen vom Schwerpunkt, d.h. ein Maß für die räumliche Ausdehnung des Teilchens.

Eine besonders anschauliche Form liefert die logarithmisierte Form der Guinier'schen Beziehung:

$$\ln I = \ln I_0 - KR^2 d^2$$

Bei Auftrag von $\ln I$ gegen d^2 liefert der Ordinatenabschnitt $\ln I_0$ bzw. I_0 ; aus der Neigungstangente bestimmt man R (Abb. 20).

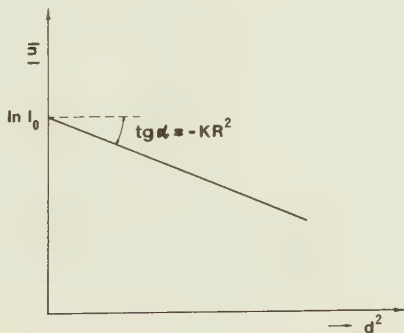


Abb. 20 Auftragung einer Streukurve nach GUINIER

Verfeinert man nun die Betrachtungsweise - zu Grunde liegt stets ein verdünntes System von Teilchen gleicher Größe und Gestalt, die alle möglichen Orientierungen im Raum haben - so stellt sich heraus, daß die Guinier-Näherung nur für den innersten Bereich der Streukurve gilt, d.h. für die Endtangente im Auftrag Abb.19.

Im mittleren und äußeren Teil treten Abweichungen (z.B. Nebenmaxima, siehe Streukurve D-OxN 3 S.34) auf, die von der speziellen Gestalt der Teilchen abhängen (24). Es sind nun theoretisch Streukurven für eine Vielzahl von einfachen geometrischen Körpern berechnet worden (25), um einer gegebenen, gemessenen Kurve eine einfache geometrische Gestalt zuzuordnen zu können, die praktisch den gleichen Streuverlauf besitzt.

Somit besteht die Auswertung einer Röntgenkleinwinkelstreuung auf "Form der Makromoleküle" in der Aufgabe, der experimentell erhaltenen Kurve einen "streuungsäquivalenten" Körper zuzuordnen (26).

Nach diesem Verfahren wurden Lösungen von M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3 bei Raumtemperatur sowie Apo M-D-OxN 2 bei 0°C vermessen. Das Apoprotein von D-OxN 2 wählte man zunächst deshalb, weil M-D-OxN 2 den zahlenmäßig größten Anteil des Komponentengemischs ausmachte^{*)}.

Um Aggregationseffekte, vor allem beim Apoprotein aber auch bei den einzelnen Holo-Komponenten zu unterdrücken, wurde das Streuverhalten in Gegenwart von 0,4 M Ammoniumsulfat^{**)} bestimmt. Trotz dieser vorsorglichen Maßnahme erwiesen sich die Enzymmoleküle, namentlich in höheren Konzentrationen, als deutlich assoziiert. In diesem Zusammenhang zeigten die einzelnen Komponenten ein abgestuftes Verhalten. M-D-OxN 1 aggregiert am stärksten, während der Trend zur Zusammenlagerung bei M-D-OxN 2 schon etwas abgeschwächt erscheint. In beiden Fällen reichte jedoch der Umweg über eine Extrapolation der Konzentration gegen 0 nicht aus, um das Streuverhalten der beiden Körper in faktisch unendlicher Verdünnung

*) siehe 3.1

**) vgl. 3.3.3 g) und 11, experimenteller Teil (Apo M-D-OxN 2 - Aggregationsverhältnisse)

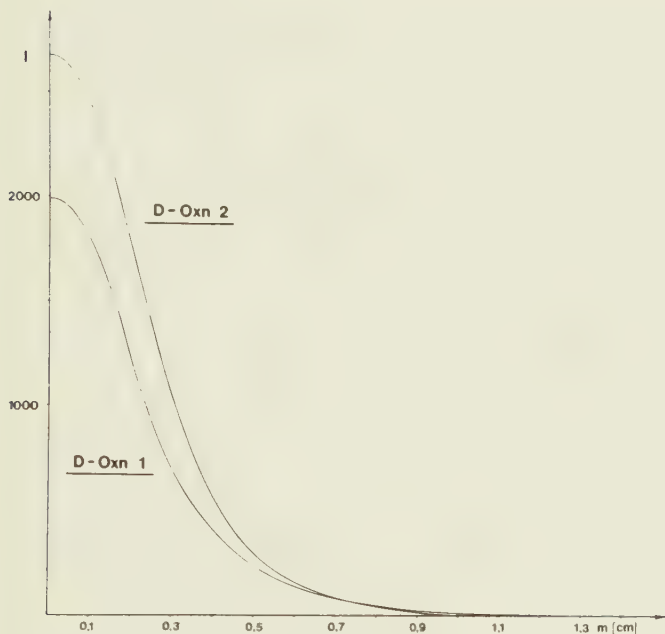


Abb.21

zu bestimmen. Letzten Endes führt das zu einem fehlerhaften I_0 und verschmierten, d.h. nicht exakt bestimmbarcn Nebenmaxima. Abb.21 veranschaulicht diese Verhältnisse.

Hier werden für die Zukunft noch umfangreichere Messungen, besonders zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation, nötig sein.

Bei M-D-OxN 3 und noch mehr beim Apo M-D-OxN 2 ist die Lage wesentlich günstiger. Hier läßt sich durch Extrapolation C gegen 0 wenigstens rechnerisch eine Monodispersität

ermitteln, daran erkenntlich, daß die Streuintensitäten im Bereich $C = 0$ (vgl. Abb. 39/Seite 73) höher liegen als die der geringsten vermessenen Konzentration.

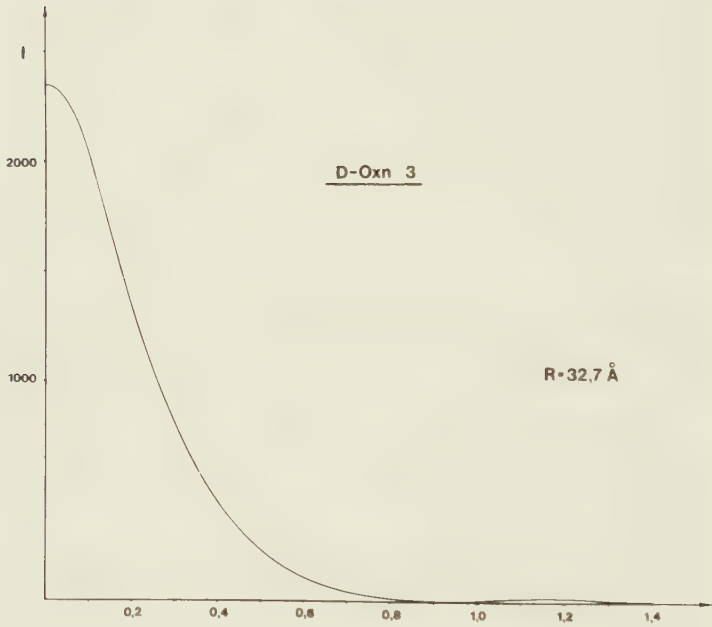


Abb. 22



Abb.23

Das entspricht den theoretischen Erwartungen. Sind im endlichen Konzentrationsbereich noch Interferenzen und damit eine Abschwächung der meßbaren Streuung zu erwarten, so muß sich in Richtung C gegen 0 - die Partikel gewinnen untereinander immer größere Abstände - dieser Effekt verlieren.

Die ermittelten Streukurven geben die Abbildungen 22 und 23 wieder. M-D-OxN 3 zeigt ein ausgeprägtes Streuverhalten und liefert ein Nebenmaximum. Apo M-D-OxN 2 besitzt dagegen ein vergleichsweise größeres I_0 mit rascherem Abfall der Streuintensität hin zu größeren Winkeln und keine Nebenmaxima.

Schon die Streumassenradien, aber auch die unterschiedlichen Kurvenformen lassen den Schluß zu, daß es sich bei den beiden Partikelsorten um unterschiedliche Formen handeln muß.

Abb.24 und 26 bringen die gleichen Kurven in doppeltlogarithmischer Darstellung, einer Auftragsart, in der meistens die Angleichung an theoretisch berechnete Streukurven einfacher geometrischer Körper erfolgt (26).



Abb.24

Eine solche Operation bringt für M-D-OxN 3 folgende Ergebnisse:

Vom Außenteil her beurteilt entspricht das Streuverhalten einem Kreiszylinder, dessen Durchmesser und Höhe gleich groß sind.

Der Innenteil der experimentellen Kurve weist eine gewisse Abweichung vom theoretischen Verlauf auf. Diese Verfälschung wird wohl durch die Aggregation der Partikel verursacht, die trotz Extrapolation C gegen 0 noch "durchschimmert". Da sich aber die Streuung im Außenteil wesentlich konzentrationsunabhängiger verhält, ist die Formbestimmung von diesem Teil der Streukurve aus korrekt (27).

Unter dieser Voraussetzung errechnen sich die Abmessungen des Kreiszylinders zu:*)

$$\text{Durchmesser} = 44 \text{ \AA}$$

$$\text{Höhe} = 44 \text{ \AA}$$

Apo M-D-OxN 2 entspricht im gesamten Umfang dem theoretischen Streuverhalten eines Rotationsellipsoids mit dem Achsenverhältnis 1:0,5.

Für die Abmessungen ergeben sich die Werte:*)

$$\text{Länge große Achse} = 78 \text{ \AA}$$

$$\text{Länge kleine Achse} = 39 \text{ \AA}$$

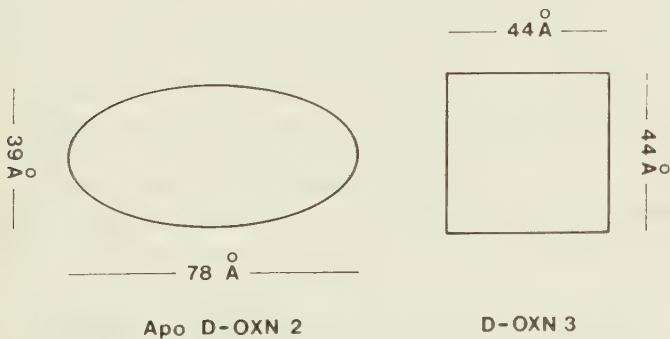


Abb.25 Größenverhältnisse (schematisch)

*) siehe unter 11. experimenteller Teil



Abb. 26

4. Zusammenfassung

Zur genauen Untersuchung der Mandel-D-Oxynitrilase war es notwendig, die bestehende Darstellungsweise so zu modifizieren, daß über ein teilkontinuierliches Verfahren größere Mengen Ausgangsprodukt ($>1\text{g/Monat}$) herstellbar waren.

Diesem Vorgang wurde eine präparative Methode - Chromatographie an Celluloseaustauscher - zur Gewinnung weiterer drei Einzelkomponenten angeschlossen.

Unterschiedliche Aktivität und gleiche Anzahl immunologisch determinanter Stellen in Tests nach OUCHTERLONY und SCHEIDEGGER ließen den ersten Verdacht auf ein Vorliegen von Isoenzymen aufkommen.

Geringe Unterschiede aus Diffusionsmessungen an Sephadex, eingehendere immunologische Untersuchungen (GRABAR-Test, Kreuzreaktionen) und nicht zuletzt die Bestimmbarkeit geringer Differenzen der isoelektrischen Punkte bestärkten in der Vermutung, daß es sich zwar vom Charakter her um Oxynitrilasen, vom genauen Aufbau ausgehend, aber um verschiedene Substanzen handeln müsse.

Versuche zur Klärung des Feinbaues dieser Komponenten erbrachten mit Sicherheit das Vorliegen gleicher Cofermente (FAD).

Nach qualitativen Vorstudien von Hydrolysebedingungen mit minimaler Huminbildung zeigte eine anschließende quantitative Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung in Bezug auf den Anteil an neutralen und sauren Typen nennenswerte Unterschiede. Besonders auffällig in diesem Zusammenhang war der vergleichsweise hohe Cysteingehalt von M-D-OxN 3 (6,3%) gegenüber den beiden anderen Komponenten (0,2% bzw. 0,5%).

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so kann gezeigt werden, daß das bisher als einheitlich angesehene Enzym Mandel-D-Oxynitrilase (E.C.4.1.2.10) in Wirklichkeit ein Gemisch von drei verschiedenen Isoenzymen M-D-OxN 1 = 7%, M-D-OxN 2 = 53% und M-D-OxN 3 = 40% darstellt.

Eine Auftrennung ist durch präparative Disc-Elektrophorese, Chromatographie an basischem Celluloseaustauscher und isoelektrische Fokussierung möglich.

Das Coenzym ist zu rund 1% am Bau der Mandel-D-Oxynitrilase beteiligt. Spaltet man dieses FAD ab und bestimmt das Molekulargewicht des resynthesefähigen, intakten Apoproteins nach dem vorgenannten Diffusionsverfahren, so kommt man zu einem wesentlich höheren Wert, als ihn das Holoferment (Iso-Gemisch) selbst liefert (83.000 gegenüber 67.000).

Dieser Effekt ist nur dadurch zu erklären, daß das Fermentmolekül bei Entfernung des Coenzyms eine räumliche Aufweitung erfährt.

Zum Studium dieser Verhältnisse wurden an verdünnten Lösungen der drei Isoenzyme und des Apoproteins von M-D-OxN 2 Röntgenkleinwinkelstreuungen vermessen.

Zunächst machte die große Neigung aller vier Körper zur Bildung von Aggregaten eine sinnvolle Bestimmung unmöglich. Durch Zusatz von Ammoniumsulfat (Puffer/0,4 M an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) konnte die Aggregation jedoch weitgehend zurückgedrängt werden.

Während hier Apo M-D-OxN 2 praktisch monodispers vorlag, wiesen die drei Isoenzyme in diesem Milieu ein untereinander abgestuftes Verhalten auf; M-D-OxN 1 war auch hier noch stark assoziiert, M-D-OxN 2 schon weniger.

Bei beiden Komponenten war aber aus diesem Grunde eine Formbestimmung vorerst nicht möglich.

Bei M-D-OxN 3 und Apo M-D-OxN 2 konnte man über eine Extrapolation der Konzentration gegen 0 zu Ergebnissen kommen.

M-D-OxN 3 stellt einen Kreiszylinder von $44 \text{ \AA}$ Durchmesser und $44 \text{ \AA}$ Höhe dar.

Das Apoprotein von M-D-OxN 2 bildet ein Rotationsellipsoid mit $78 \text{ \AA}$ großer und $39 \text{ \AA}$ kleiner Achse.

Mit der Röntgenkleinwinkelstreuung wurde ein gangbarer Weg zur Formbestimmung dieser Substanzen aufgezeigt. Da bisher nur Apo M-D-OxN 2 - und nicht Apo M-D-OxN 3 - vermessen wurde, ist eine endgültige Lösung der Frage nach der Aufweitung des Fermentmoleküls bei Coenzymabspaltung im Augenblick noch nicht möglich. Für die beiden Isoenzyme M-D-OxN 1 und M-D-OxN 2 sind in Zukunft entweder aggregatfreie Lösungsbedingungen zu schaffen oder wesentlich ausführlichere Streuungsmessungen anzufertigen, die eine exakte Extrapolation C gegen O gewährleisten.

Insgesamt gesehen lassen sich bis jetzt über vergleichende charakteristische Kenngrößen der einzelnen Isoenzyme hinaus nur beim M-D-OxN 3 weitere Aussagen machen.

Sein relativ hoher Gehalt an Cystein (Aminosäureanalyse) läßt es als ein strukturell sehr geordnetes Gebilde erscheinen.

Daraus dürfte seine geringe Neigung zur Aggregation (Röntgenkleinwinkelstreuung) zu erklären sein. Die vergleichsweise hohe Enzymaktivität bestätigt diese Vermutungen.



E x p e r i m e n t e l l e r T e i l

1. Darstellung von hochreiner D-Oxynitrilase

Das bestehende, von BECKER (6) ausgearbeitete Verfahren wurde seinem Gang nach beibehalten.

a) Rohemulsin (Extraktion)

Als Ausgangsprodukt dient käufliches, entfettetes Bitter- und Süßmandelmehl.

Durch 12-15 stündiges Schütteln mit verdünntem Ammoniak werden Oxynitrilase, β -Glukosidase und weitere Proteinkörper aus dem Rohprodukt herausgelöst. Den Rückstand zentrifugiert man ab.

Ein Ansatz umfaßt 375 g Mandelmehl in 3,5 l Wasser. Die Mischung wird mit verdünntem Ammoniak auf p_H 7,5 eingestellt.

Die Lösung bringt man mit 6 N Essigsäure auf einen p_H von 5,4. Nach Abkühlung auf 3-4°C wird der entstandene Niederschlag wiederum abzentrifugiert und verworfen.

Das vierfache Volumen Äthanol fällt aus der Lösung ein Rohemulsin, das sich nach zweitägigem Stehen im Kühlschrank gut abzentrifugieren läßt. Es wird im Vakuumexsikator über Blaugel getrocknet und anschließend im Mörser zerkleinert.

Aus 375 g Rohprodukt erhält man im Schnitt 10-15 g Emulsin.

b) Rohferment (Chromatographie an Cellulose-Austauscher)

20g Emulsin werden in 1,5 l Wasser aufgelöst (2-3 Stunden schütteln, mit verdünntem Ammoniak auf p_H 7,5 einstellen). Nach dem Abzentrifugieren eines unlöslichen Rückstandes wird in diese Lösung direkt ECTEOA-Cellulose (Cl'-Form)*) eingerührt und das Ganze 2 Stunden weiter geschüttelt. Hernach zentrifugiert man abermals ab, schlämmt den beladenen Austauscher in Wasser auf und füllt damit zwei Chromatographiesäulen (3 x 30 cm).

*) Lieferant: SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg

Als Eluationsmittel dient 0,1 M Pyridinacetat-Puffer p_H 5,0. Zuerst trennt sich in grauer, deutlich sichtbarer Zone die β -Glukosidase ab, dann folgt der gelbe Bereich mit D-Oxynitrilase. Aus diesem Eluat wird mit kristallinem Ammoniumsulfat ein gelbbraunes Rohferment gefällt.

c) Hochreine D-Oxynitrilase (Gelfiltration)

Im Gegensatz zu (6) wird die gesamte Menge abzentrifugiertes Rohferment eines Ansatzes in 0,1 M Natriumpyrophosphat - Puffer p_H 7,5 gelöst und an Sephadex G-100 - Säulen im Kühlraum bei 13°C gelfiltriert.

In Abb.27 sind die wesentlichen Punkte der Feinst-Reinigung als Block zusammengefaßt.

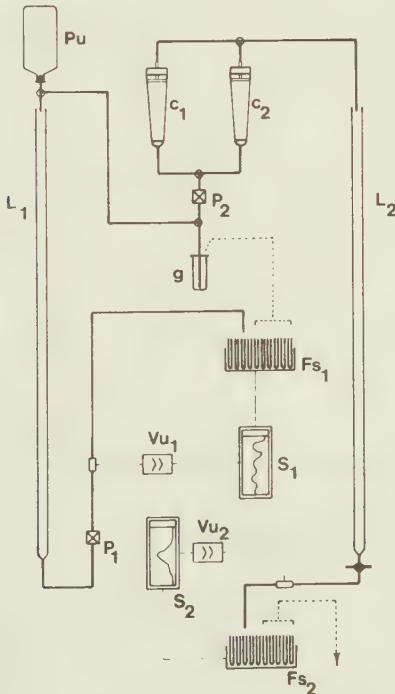


Abb.27 Enzym - Feinstreinigung

- L_1, L_2 Säulen mit Sephadex G 100
Länge 230 cm bei 40 mm Durchmesser
- Pu Puffer - Vorrat 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; p_H 7,5
- P_1, P_2 Dosierpumpen VaP 21
(Fa. Bender & Hobein, München)
- Fs_1, Fs_2 Fraktionssammler Radi-Rac
(Fa. LKB Produkter, Stockholm)
- Vu_1, Vu_2 Uvicord Durchflußphotometer I (253,7 m μ) Typ LKB
4701 A
- S_1, S_2 LKB 6520 A Fallbügelschreiber
(sämtl. von Fa. LKB Produkter, Stockholm)
- c_1, c_2 Konzentrationskammern
Antrieb von P_1, P_2 durch Motoren der Type RZR der
Fa. Heidolph Elektro KG, Kelkheim

Das Rohferment wird auf die Säule L_1 mit dem Puffervorrat Pu aufgetragen. Nach Passage von L_1 kann im Fraktionssammler Fs_1 , der mit einer registrierenden Durchflußphotometer-Einheit Vu_1/S_1 gekoppelt ist, eine schon relativ reine, gelbe D-Oxynitrilase - Fraktion geschnitten werden.

Diese wird in den Behälter g überführt und mittels P_2 langsam (6 ml/h) in die Konzentrationskammer c_1 (vgl. Abb. 28) gepumpt. Hier spielt sich folgender Vorgang ab: Die Lösung dringt von unten her in eine Schicht trockenes Sephadex G-25 coarse (für umseitig angegebene Kammerabmessungen 96 g). Lösungsmittel- und Pufferbestandteile können auf Grund ihrer Dimensionen ungehindert in das Gelgerüst eindiffundieren, während die großvolumigen Enzymmoleküle quasi im Ausschlussvolumen laufen. Auf diese Weise wird bei konstantem p_H und gleichbleibender Ionenstärke eingengt. Nach Eintrag der Enzymlösung pumpt man aus Pu reinen Puffer nach. Mit dem stetig nachfolgenden Puffer wächst die Höhe des Gelbetts durch Quellung immer mehr, das Enzym sammelt sich, gut sichtbar, an dem immer schmaler werdenden Grenzbereich zwischen "naß und trocken" und tritt nach Erschöpfung der Sephadex - Kapazität in schmaler, hochkonzentrierter Zone aus. Der nachfolgende Puffer drückt dann diese konzentrierte Lösung aus der Kammer direkt auf

Abb. 28

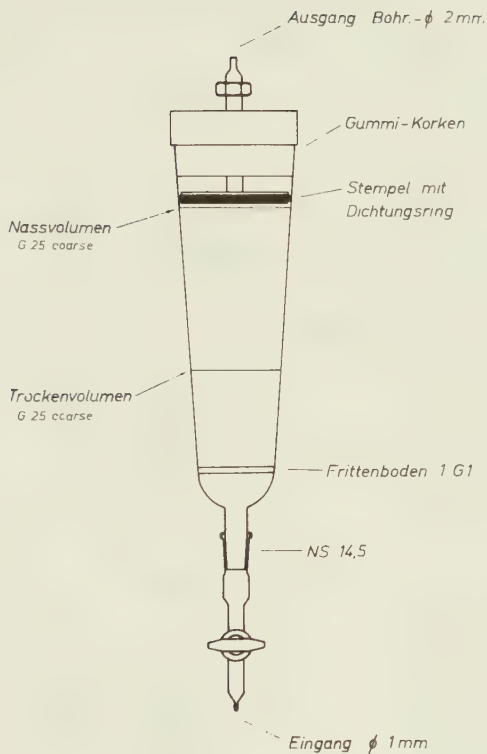


Abb.28 Konzentrationskammer

Frittendurchmesser 40 mm, Durchmesser am oberen Rand 75 mm, Höhe ab Frittenboden 215 mm

Auf diese Weise kann entgegen bisherigen Veröffentlichungen (ca. 2,5-3 (32)) ein Konzentrationsfaktor von 10 und mehr erreicht werden.

Die Reinigung des Dextrans erfolgt direkt in der Kammer durch Spülung mit bidest. Wasser bis zur absoluten Salzfreiheit. Anschließend wird das Sephadex G-25 coarse

gefrieretrocknet und erneut eingesetzt.

Auf der Säule L_2 wird der Reinigungsvorgang nochmals wiederholt, über Vu_2/S_2 kontrolliert und in Fs_2 schließlich das hochreine Enzym entnommen.

Bei erneutem Einsatz von L_1 erfolgt eine Konzentrierung jetzt in Kammer c_2 , während der Inhalt von c_1 aufgearbeitet wird.

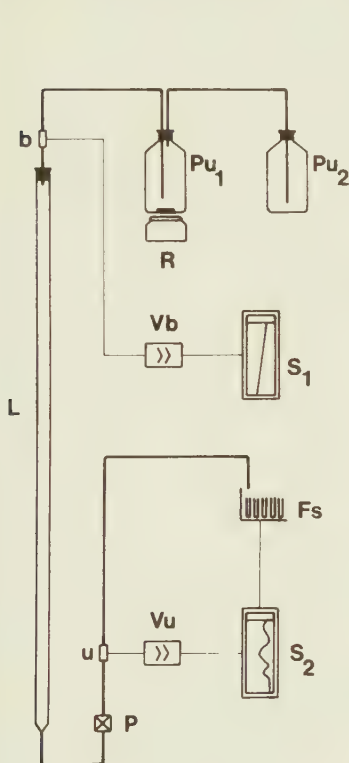
Betriebsdaten:

Durchsatz von L_1, L_2	= 20 ml/h
Laufzeit $OxN^{*)}$	= 48 h
Zahl der Frakt. mit OxN	= 20 (10 h)
Fraktionsfolge am Radi Rac	= 30 min. = 10 ml

*) gerechnet von Aufgabe Rohferment bis Ende Auslauf von OxN

2. Auftrennung der Mandel-D-Oxynitrilase in einzelne Komponenten

Der Gang der Gradiententrennung von hochreiner D-Oxynitrilase wurde bereits unter 3.1 S.4 beschrieben, die apparativen Einzelheiten sind in Abb.29 aufgeführt.



- L = Chromatographiesäule
Länge 65 cm $\varnothing$ 1,4 cm
- b = Leitfähigkeitszelle
- Vb = stabilisierte Messbrücke Brückenspannung 18 V $\sim$; gleichgerichteter Brückenquerstrom geht über eine Anpassung an:
- S₁ = Schreiber Typ Hartmann & Braun K65 Z5-778
Messbereich 1 mV auf 30 cm Registrierbreite
- R = Rührmotor (Magnetrührer)
- P = Dosierpumpe VaP 21 (Fa. Bender & Hobein, München) mit Motor Typ RZR (Fa. Heidolph Elektro KG., Kelkheim)
- u/Vu = LKB 4701 A Uvicord Durchflußphotometer (Fa. LKB Produkter, Stockholm)
- S₂ = LKB 6520 A Fallbügel-schreiber (Fa. LKB Produkter, Stockholm)
- Fs = Fraktionssammler LKB Radi Rac (Fa. LKB Produkter, Stockholm)
- Pu₂ = Vorratsgefäß für konz., 0,15 M Sörensen-Puffer p_H 6,0
- Pu₁ = Gefäß für Vorlage verd., 0,01 M Sörensen-Puffer p_H 6,0

Abb.29 Versuchsanordnung zur Gradiententrennung

Betriebsdaten:

Auftragsmenge Ferment : 170 mg Mandel-D-Oxynitrilase in
0,01 M Sörensen - Puffer p_H 6,0

Vorlagemenge in Pu_1 : 300, 500, 700 ml 0,01 M Sörensen -
Puffer p_H 6,0; 700 ml = optimale
Menge in Bezug auf Trenngüte

Durchsatz von L : 22 ml/h

Fraktionsfolge am
Radi Rac : 30 min. = 11 ml

Füllmaterial : Celluloseaustauscher Whatman DE 32

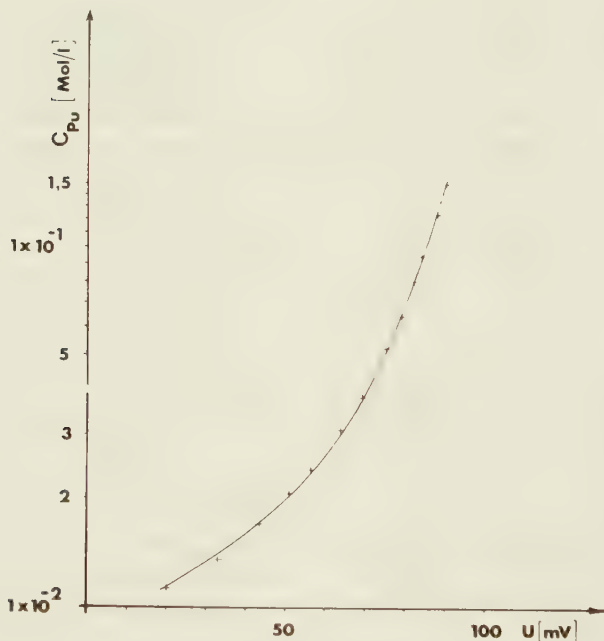


Abb.30 Eichkurve
Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der
Pufferkonzentration

Die bestehenden, korrespondierenden Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Gradienten in zeitlicher Hinsicht veranschaulicht Abb.31.

Da das Ferment gelb gefärbt und damit der Elutionsverlauf auf der Säule auch optisch gut erkennbar ist, kann man die zurückgelegten Wege, z.B. von Peak 1 = M-D-OxN 1

Stunden- Laufzeit	Front Peak 1 [mm]			U - Gradient [10 ⁻² mV]			C - Gradient [10 ⁻² Mol/l]		
	300	500	700	300	500	700	300	500	700
2	5	1		62	48	39	2,8	1,9	1,6
3	10	3		67	59	47	3,4	2,5	1,8
4	19	5		70	62		3,9	2,9	
5	28	7		73	66		4,5	3,3	
6	40	8		75	68		5,0	3,5	
7	57	10		77	70		5,6	3,8	
8	85	13	4	78	72		6,0	4,2	
9	106	19		79	73		6,4	4,5	
10,0		27	11		75			4,9	
10,5	142			81			7,0		
11,0		35	13		75	71		5,1	4,1
11,5	181			81			7,3		
12,0		43			76			5,4	
12,5	240			82			7,6		
13,0			22			73			4,6
13,5	305			84			8,6		
14,0									
14,5	360			85			9,3		
15,0		81			78			6,0	
15,5	430		37	85		76			5,4
16,0									
16,5	500			86			10,0		
17,0									
17,5	600			86			10,3		
18,0		142			80			6,6	
18,5									
19,0			70			78			6,0
19,5				87			10,7		
20,0		205			81			7,0	
20,5									
21,0		270	107		81	78		7,4	6,0
21,5				88			11,7		
22,0		325	120		82	79		7,6	6,4
22,5									
23,0			136						
23,5		450		88				8,0	
24,0			162			80			6,6
24,5									
25,0			190			80			6,8
25,5				88			12,5		
26,0			220			81			7,3
26,5									
27,0									
27,5				89					
28,0			290			83			8,3
28,5									
29,0									
29,5				89			13,5		
32,0			430			84			9,0

Tabelle 2

durch einfaches Abmessen gut verfolgen.

Abb.32 zeigt deutlich, daß nach einer gewissen Zeit und damit einer bestimmten Gradientenkonzentration, M-D-OxN 1 mit konstanter Beschleunigung über die Säule wandert. Das gilt, wenn auch vorläufig nicht im einzelnen untersucht, ebenso für die Anteile M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3.

Die "Säulenbeweglichkeit" des Anteils M-D-OxN 1 in Abhängigkeit von der Gradientenkonzentration - mit Vorlagemenge verdünntem Puffer in Pu_1 als Parameter - gibt Abb.33 wieder. Auch hier läuft dieser Anteil von einem bestimmten Punkt an in quasi gleichförmig beschleunigter Bewegung. Extrapoliert man die geradlinig verlaufenden Kurventeile auf den Weg 0, so wird in allen drei Fällen der gleiche Schnitt-

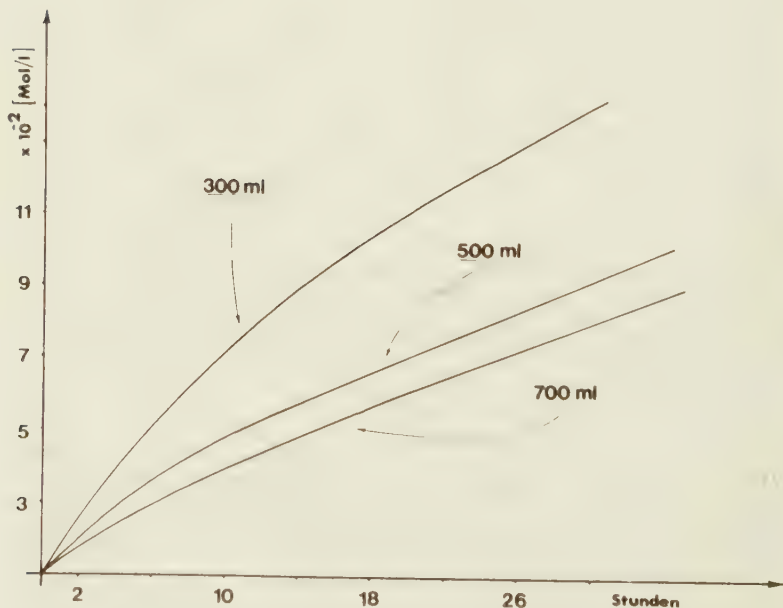


Abb.31 Gradientenverlauf

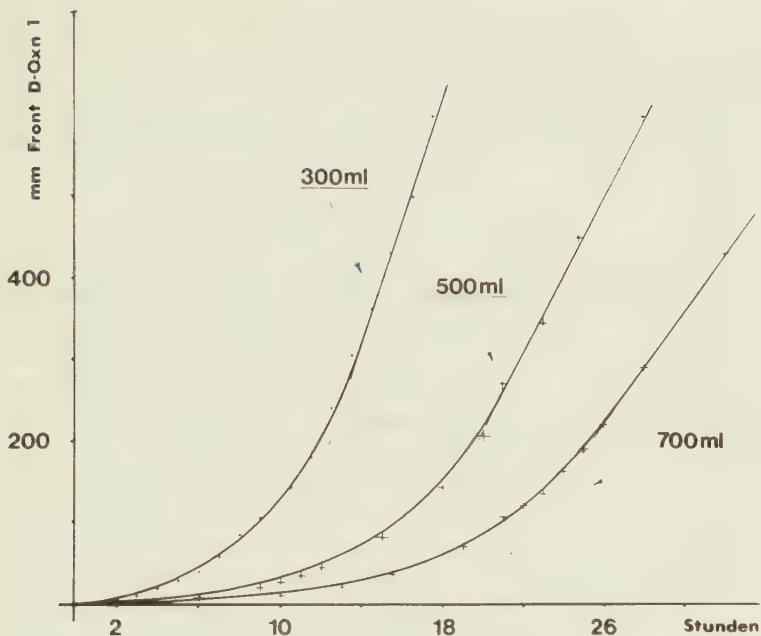


Abb.32 Wanderungsgeschwindigkeit von M-D-OxN 1 an Whatman Celluloseaustauscher DE 32 bei verschiedenen Konzentrationsgradienten

punkt mit der Abszisse:

$$C_0 = 6,5 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$$

erhalten.

Die noch steilere "700 ml - Kurve" ist zu Gunsten einer klaren Darstellung nicht eingezeichnet.

Man kann dieses Ergebnis folgendermaßen deuten:

Im ausgeprägten Kurventeil, d.h. einem Konzentrationsgebiet $\leq C_0$ bestimmen wohl neben intramolekularen Wechselwirkungen mit der HO-Matrix im wesentlichen elektrostatische Kräfte zwischen lokalen Ladungsbereichen am Protein und Cellulosegerüst die Haftung des Enzyms.

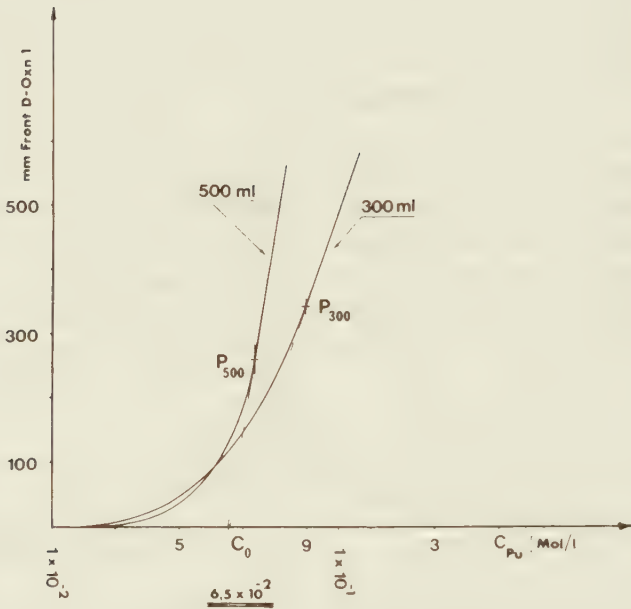


Abb.33 Säulenbeweglichkeit von M-D-OxN 1 an DE 32 in Abhängigkeit von der Gradientenkonzentration

Mit zunehmender Gradientenkonzentration geht dieser Bindungsanteil durch Absättigung mit Pyrophosphat - Ionen mehr und mehr zurück.

Im geradlinigen Verlauf - ab P_{300} bzw. P_{500} - dürften nur noch Adsorptionskräfte an die Matrix wirksam sein, die selbst auch im gleichen Maße abnehmen, wie der Konzentrationsgradient ansteigt (Verdrängung durch kleinvolumige Ionen).

C_0 würde somit theoretisch den Konzentrationspunkt darstellen, bei dem sich das Enzym unter Annahme ausschließlich

adsorptiver Haftung gerade noch an der Cellulosematrix hält.

Während dieses, durch Extrapolation erhaltene C_0 für alle drei Parameter gleich zu sein scheint, weist P eine Abhängigkeit auf. Je schneller die Ionenkonzentration im Gradienten ansteigt ($Pu_1 = 300 \text{ ml}$), desto größer wird der Wert von P.

$$\left. \begin{array}{l} P_{300} = 9,0 \\ P_{500} = 7,4 \\ P_{700} = 7,0 \end{array} \right\} \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$$

Das scheint mit der statistischen Verteilung und Besetzung der Ionen sowohl auf der Proteinoberfläche als auf der Matrix zusammenzuhängen und vielleicht auch mit der Tatsache, daß solche ionischen Verdrängungen einem Gleichgewicht unterliegen, dessen Einstellung gewisse Zeit erfordert.

In der Praxis jedenfalls nähert sich mit steigender Trenngüte P immer mehr C_0 an.

Diese aufgezeigten Verhältnisse wurden vorläufig nur beim Anteil M-D-OxN 1 studiert. Ein zu erwartendes ähnliches Verhalten der anderen beiden Komponenten M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3 wird in Zukunft zu untersuchen sein.

Präparation und Regenerierung von Whatman Celluloseaustauscher DE 32.

Der fabrikneue oder regenerierte Austauscher wird in 0,15 M Sörensen - Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) p_H 6,0 eingerührt und darin 15 Minuten belassen. Danach saugt man das Austauschermaterial auf einem Büchner-Trichter ab und schlämmt es erneut, diesmal allerdings in 0,01 M Puffer gleichen Typs, auf. Diesen Vorgang wiederholt man mindestens dreimal.

Dieser, mit Phosphat beladene Austauscher wird nun für die Säulenfüllung verwendet. Günstig erweist es sich, wenn man die Säule 24 Stunden lang mit dem bei der Gradienten-Elution verwendeten Anfangspuffer - 0,01 M - äquilibriert und Äquilibrierung wie Trennung im Kühlraum bei Temperaturen

um oder unter 10°C vornimmt (Bildung von Gasblasen durch Bakterien!)

Der gebrauchte Austauscher wird wie folgt regeneriert:
Das Material wird in 0,5 N Salzsäure aufgeschlämmt und darin für etwa 30 Minuten belassen. Danach dekantiert man und wäscht so lange mit dest. Wasser auf einem Büchner-Trichter nach, bis die Waschflüssigkeit p_{H}^4 hat. Danach schlämmt man das schwach saure Austauschermaterial in 0,5 N Natronlauge auf, saugt ab, wiederholt diesen Vorgang und wäscht schließlich neutral.

3. Disc-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gel

Durchgeführt wurde mit geringfügigen Abänderungen die von DAVIES (28) beschriebene Methode mit Gel-Säulen von 7 x 0,5 cm.

Gelbereitung:

a) Trenngel

6% ige Lösung von Acrylamid in 3 M Tris-HCl-Puffer, p_H 8,9, Katalyse mit Ammonpersulfat (Chemopolymerisation), Polymerisationsdauer: 60 min.

b) Sammelgel

4% ige Lösung von Acrylamid in 0,5 M Tris-HCl-Puffer, p_H 6,7, Katalyse mit Riboflavin (Photopolymerisation), Polymerisationsdauer: 30 min.

c) Probengel

Wie unter b); Polymerisationsdauer: 60 min.

Elektroden-Puffer:

Tris-Glykokoll (0,05 M Tris, 0,4 M Glykokoll) von p_H 8,3, Zusatz von 1% iger Bromphenolblau-Lösung zur Markierung der Pufferfront.

Stromstärke: 4 mA/Säule

Laufzeit: 40-45 min.

Färbung: 0,5% Amidoschwarz 10B in 7% iger Essigsäure.

4. Aktivitätsbestimmungen

a) Drehtest (Polarimetrische Methode)

Gemessen wird die Drehung des gebildeten, optisch aktiven D-(+)-Mandelsäurenitrils als Funktion der Zeit.

In ein Messkölbchen von 25 ml, das 22 ml 0,05 M 50% igen äthanolischen Natriumacetat-Puffer von p_H 5,4 enthält und auf 20°C im Ultra-Thermostaten temperiert ist, werden in Folge 1 ml (10mMol) wasser- und säurefreier Benzaldehyd, 1 ml D-Oxynitrilaselösung ($C = 1$ mg/ml) in Pyrophosphat-Puffer p_H 7,5 und 1 ml (13mMol) einer Mischung von wasserfreier Blausäure/äthanolischem Acetat-Puffer im Verhältnis 1:1 gegeben, umgeschüttelt und 5 sec. nach Beginn der Durchmischung der Reaktionsanfang festgelegt.

Die Messung des Drehwinkels erfolgte nach Überführung der klaren Lösung in ein Polarimeterrohr von 10 cm Länge im ZEISS - Kreispolarimeter 0,01°.

Das Polarimeterrohr war ebenfalls durch das gleiche Bad temperiert, das auch die vorbereiteten Messkölbchen beherbergte.

Für das Gemisch und die Einzelkomponenten ergaben sich folgende Drehwinkel:

Reakt.Zt. [min]	D-OxN 1	D-OxN 2	D-OxN 3	Gemisch D-OxN
1,5	0,17°	0,38°	0,51°	0,50°
2	0,25°	0,51°	0,72°	0,75°
3	0,35°	0,77°	0,97°	0,93°
4	0,48°	0,89°	1,24°	1,19°
5	0,62°	1,09°	1,46°	1,40°
6	0,68°	1,27°	1,64°	1,61°
8	0,87°	1,59°	2,01°	1,93°
10	1,05°	1,80°	2,26°	2,19°

Tabelle 3

4'-Drehwerte:

Gemisch M-D-OxN	1,19°
M-D-OxN 3	1,24°
M-D-OxN 2	0,89°
M-D-OxN 1	0,48°

b) Spalttest (Photometrische Methode)

Gemessen wird die zeitliche Zunahme der Extinktion der Carbonylbande des Benzaldehyds bei 249,6 μ in einem registrierenden ZEISS - Spektralphotometer RPQ 20 A.

Verfahren:

Man füllt in eine 1 cm - Küvette eine frisch angesetzte und in einem eisgekühlten Messkölbchen aufbewahrte 10^{-4} M Lösung von Mandelsäurenitril (3 x umkristallisiert aus Petroläther/ CS_2 = 1:2) in 0,1 M Natriumacetat-Puffer p_H 5,4.

Nach Registrierung bei 249,6 μ über 4 min. (symmetrischer Zerfall) wird mittels Enzympipette 5 λ Enzymlösung (C = 1 mg/ml im gleichen Puffer) zugegeben, durchgemischt (Luft durchblasen!) und die Extinktionszunahme über weitere 4 min. bestimmt.

Vorschub am RPQ 20 A : 3 cm/min.

Messergebnisse:

<u>Vorschub [cm]</u>	<u>M-D-OxN 1</u>	<u>M-D-OxN 2</u>	<u>M-D-OxN 3</u>
5	0,23	0,40	0,59
10	0,36	0,57	0,91
20	0,54	0,88	1,13
30	0,74	1,05	1,24
40	0,88	1,17	1,29
50	1,00	1,22	1,32
60	1,07	1,27	1,34
70	1,13	1,30	1,35
80	1,18	1,33	
90	1,22	1,35	1,36
100	1,26	1,37	

Tabelle 4

5. Isoelektrische Fokussierung

d.h. Trennung von Ampholyten nach ihren isoelektrischen Punkten entlang eines p_H - Gradienten im elektrischen Feld.

Apparatur^{*)} und Versuchsdaten:

a) Grobmessung, Bereich p_H 3 - 10 mit 40% iger

Ampholine-Lösung (Träger-Ampholyt).

Säule: Typ LKB 8101 - 110 ml

Anoden-Puffer: 0,8 ml konz. Phosphorsäure + 56 ml aq. dest.
+ 48 g Sucrose^{**)}

Kathoden-Puffer: 0,8 ml Äthylendiamin + 40 ml aq. dest.

Zur Herstellung des Dichtegradienten werden zunächst 2,5 ml 40% ige Ampholine-Lösung auf 10 ml mit aq. dest. verdünnt.

spezif. dichte Lsg.: 7,5 ml dieser v.g. Lösung werden mit
(60 ml) aq. dest. auf 42 ml aufgefüllt und
darin 28 g Sucrose gelöst.

spezif. leichte Lsg.: die verbleibenden 2,5 ml konz. Ampholine werden mit aq. dest. auf 60 ml aufgefüllt.

Nach Einfüllen des schweren Anoden-Puffers wird der Dichtegradient direkt vom Gradientenmischer mit angeschlossenen Rührmotor (Typ LKB 8121/8123-1) in die Säule eingebracht.

Bei Erreichen der halben Füllhöhe löst man in 2 ml Gradienten der dort herrschenden Dichte ca. 10 mg salzfreies Enzym, schichtet diese Lösung über die bisher eingetragene Menge und läßt danach die andere Hälfte der Säulenfüllung aus dem Mischer zulaufen. Den Abschluß bildet der Kathoden-Puffer.

Damit befindet sich das Ferment in Form eines schmalen, gut sichtbaren, gelben Ringes genau in der Säulenmitte zwischen Anode und Kathode.

*) Apparatur und Ampholine-Lösungen von: Fa. LKB-Produkt, Stockholm

**) Lieferant: Malinckrodt Chemical Works, St. Louis USA

Dauer der Trennung: 35 Stunden bei 200, letztlich
400 Volt.

Die Entleerung der Säule erfolgt mit einer Dosierpumpe
VaP 21 (Fa.Bender & Hobein, München) über ein registrie-
rendes Uvicord Durchflußphotometer LKB 4701 A / 6520 A
(Fa.LKB Produkter, Stockholm) mit nachgeschalteter p_H -
Durchflußelektrode Nr.430 (Fa.Ingold, Frankfurt).

p_H - Kontrolle geschieht kontinuierlich mit einem p_H -Meter
Typ 350 (Fa.Knick, Berlin) über einen angeschlossenen
Schreiber VOM 6 (Fa.Bausch & Lomb).

Diese Grobmessung gibt 3 Komponenten mit isoelektri-
schen Punkten zwischen p_H 4 und 5.

b) Feinmessung, Bereich p_H 4 - 6 mit 8% iger Ampholine-
Lösung (Träger-Ampholyt)

Anoden-Puffer: wie unter a)

Kathoden-Puffer: wie unter a)

spezif.dichte Lsg.: 9,4 ml 8% ige Ampholine-Lsg. werden
(60 ml) mit aq.dest. auf 42 ml aufgefüllt
und darin 28 g Sucrose gelöst.

spezif.leichte Lsg.: 3,1 ml 8% ige Ampholine-Lsg. werden
(60 ml) auf 60 ml mit aq.dest. aufgefüllt.

Gradientenmischung, Füllung der Säule und Probeneintrag
erfolgt wie unter a) angegeben.

Trenndauer: 35 Stunden bei schrittweisem Übergang von
300 zu 400, 500 und letztlich 600 V.

Das Ergebnis dieser Feinmessung ist in Abb.34 dargestellt.

p_H - Verlauf und Absorption bei 253,7 m μ sind synchron
mit dem Säulenauslauf wiedergegeben.

Es resultieren 3 Substanzen:

Komponente 1 IP = 4,415 p_H

Komponente 2 IP = 4,430 p_H

Komponente 3 IP = 4,460 p_H

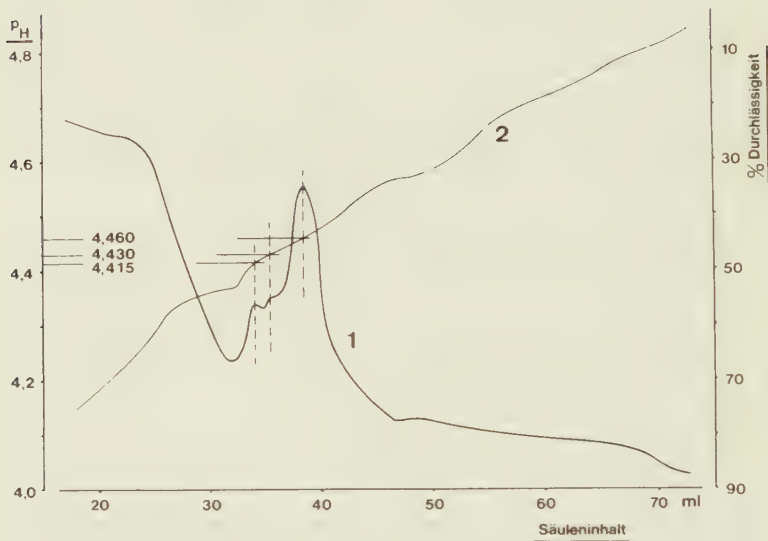


Abb.34 Isoelektrische Fokussion von hochreiner Mandel-D-Oxynitrilase

Kurve 1 Absorption bei 253,7 mu (Uvicord)

Kurve 2 p_H - Verlauf

6. Molekulargewichtsbestimmungen durch Diffusionsmessungen an Gelgerüsten definierter PorengröÙe

Säulenfüllung: Sephadex G-150

Puffer: 0,1 M Pyrophosphatpuffer; 0,4 M an NaCl. p_H 7,5

Durchsatz: 11,1 ml/h

Temperatur: $1 \pm 0,1^\circ C$

aktive Säulenlänge: 970 mm

Säulendurchmesser: 17,5 mm

	s (mm)	s/s ₀	lg MG	MG
Eichung:				
Transferrin ^{*)}	118,8	1,370	4,954	
Human-Albumin ^{*)}	123,5	1,424	4,839	
Trypsin ^{**)}	166,2	1,917	4,377	
Ribonuclease ^{***)}	206,3	2,379	4,143	

Messung:

Mandel-D-OxN 1	132,3	1,521	4,793	62.100
Mandel-D-OxN 2	133,0	1,529	4,786	61.100
Mandel-D-OxN 3	133,5	1,534	4,782	60.500

Nacheichung:

Human-Albumin	124,0	1,425		
---------------	-------	-------	--	--

s₀ - Bestimmung:

Blue Dextran	86,7
Blue Dextran	86,7

Als Maß für das Elutionsvolumen V wurde der Papiervorschub s des Schreibers, gerechnet vom Auftragungsbeginn bis Peak-Mitte, gewählt, nachdem in Vorversuchen die strenge Proportionalität zwischen V und s gezeigt werden konnte. Das Ausschlußvolumen V₀ wurde mit Blue Dextran (MG: 2.000.000) bestimmt.

^{*)} Fa. Behringwerke Marburg

^{**)} Fa. Serva, Heidelberg

^{***)} Koch u. Light Labs., Colnbrook, Engl.

7. Isolierung und Identifizierung der prosthetischen Gruppe der drei Komponenten

Isolierung:

1 ml wässrige Lösung der drei Substanzen werden mit einigen Tropfen 1 N HCl versetzt. Bei Zimmertemperatur erfolgt eine sofortige Ausfällung von farblosem, denaturiertem Protein. Nach Zentrifugieren dekantiert man die jeweilige klare, grünlich fluoreszierende Lösung ab und entfernt die Salzsäure durch Gefriertrocknung. Der Rückstand wird in wenigen Tropfen Wasser aufgenommen.

Papierchromatographie: (6)

Als Fliessmittel wurde eine 6,6% ige Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ in aq.dest. eingesetzt. Man arbeitete nach der absteigenden Methode auf Papler Nr.202 der Fa. Binzer, Hatzfeld/Eder.

a) Vergleich mit FAD aus hochreiner Mandel-D-Oxynitrilase, käuflichem FAD und FMN*):

	R_f -Werte	
	gefunden	Literatur (30)
FAD	0,43	0,38
Coferment aus M-D-OxN 1	0,43	
Coferment aus M-D-OxN 2	0,43	
Coferment aus M-D-OxN 3	0,43	
FAD aus Mandel-D-OxN	0,43	
FMN	0,59	0,50

Bei (30) wird als Fliessmittel eine nur 5% ige Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat eingesetzt.

b) Vergleich mit modifizierten Coenzymen

	R_f -Werte
FAD	0,43
3-Methyl-FAD	0,55
3-Carboxy-FAD	0,52
2-Morpholino-FAD	0,46
FGD	0,43
FID	0,49

*) Lieferant: Fa. Roth, Karlsruhe

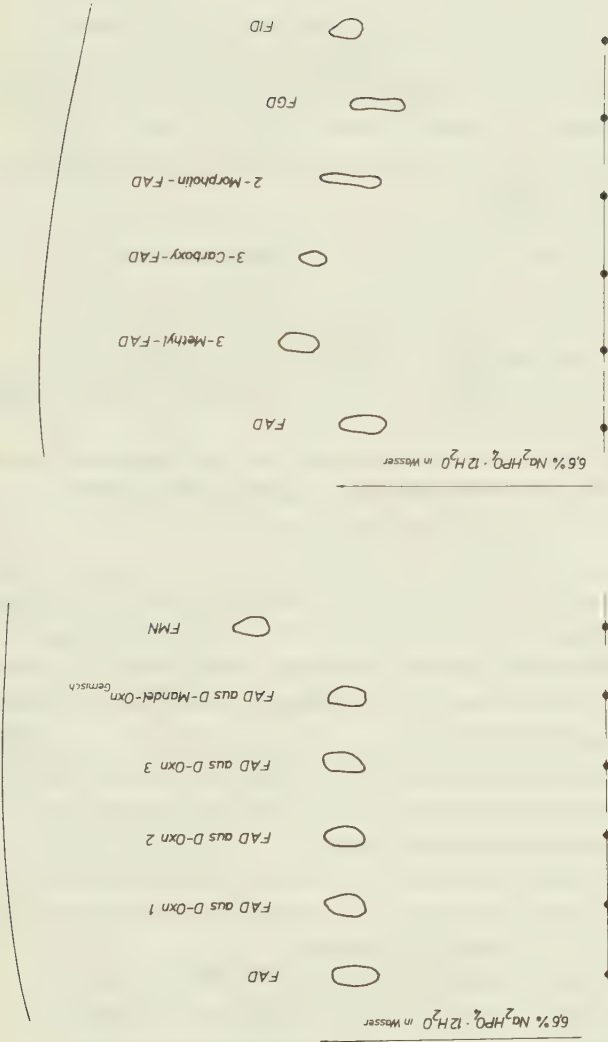


Abb. 35 Papierchromatogramme zur Identifizierung der prosthetischen Gruppe

8. Immunologische Untersuchungen

Immunisierung:

a) Emulsin - Antiserum

Zu seiner Gewinnung erhielt ein männliches Kaninchen (Klein-Chinchilla, Alter: 1 Jahr, Erka-Mischfutter Z 6000, Haltung: Einzelbox) insgesamt 180 mg Emulsin (Trockenpräparat nach Alkoholfällung), verteilt auf 3 Injektionen über einen Zeitraum von 7 Tagen in Verbindung mit Bacto-Adjuvans Freund (Difco).

1.Tag: 30 mg Emulsin in 1,0 ml 0,9% NaCl + 0,05 ml Adjuvans komplett i.m. rechter Schenkel

2.Tag: 60 mg Emulsin in 2,0 ml 0,9% NaCl + 0,1 ml Adjuvans komplett i.m. linker Schenkel.

7.Tag: 90 mg Emulsin in 2,0 ml 0,9% NaCl + 2,0 ml Adjuvans komplett jeweils 1 ml i.m. rechter und linker Schenkel.

Am 22.Tag erfolgte die Blutentnahme aus der Ohrvene (30 ml). Das Serum wurde mit Natriumazid 1: 1000 stabilisiert.

b) Antiseren aus den Einzelkomponenten

3 männliche Ratten (Wispar, Alter 6 Monate, Futter: Altromin R 6, Wasser ad lib., Haltung: Makrolonkäfig) erhielten insgesamt 3,2 mg der jeweiligen, disc-elektrophoretisch reinen Komponente M-D-OxN 1, M-D-OxN 2 und M-D-OxN 3 verteilt auf 5 Injektionen über 41 Tage zusammen mit Bacto-Adjuvans Freund (Difco).

1.Tag: 0,2 mg M-D-OxN in 0,2 ml 0,9% NaCl + 0,1 ml Adjuvans komplett i.m. rechter Schenkel und Lymphknotenregion links.

2.Tag: 0,4 mg M-D-OxN in 0,4 ml 0,9% NaCl + 0,2 ml Adjuvans komplett i.m. linker Schenkel und Lymphknotenregion rechts.

4.Tag: 0,6 mg M-D-OxN in 0,6 ml 0,9% NaCl + 0,2 ml Adjuvans komplett i.m. linker und rechter Schenkel, sowie beide Lymphknotenregionen.

32.Tag: 1,0 mg M-D-OxN in 1,0 ml 0,9% NaCl + 0,2 ml Adjuvans komplett i.m. beide Schenkel und Lymphknotenregionen.

41.Tag: 1,0 mg M-D-OxN in 1,0 ml 0,9% NaCl + 0,2 ml Adjuvans komplett i.m. beide Schenkel und Lymphknotenregionen.

Am 50.Tag erfolgte die Blutentnahme durch Coupierung der Schwanzspitze (2 ml).

Agargel - Diffusionstest nach OUCHTERLONY (7):

Das Verfahren wurde auf 5 x 5 cm Dia-Platten (Lagerung in Petrischalen mit wassergesättigter Atmosphäre) durchgeführt.

Agargel: 1% iger Reinagar (Behringwerke Marburg) in Sörensen-Puffer (0,05 M Na_2HPO_4 , 0,05 M KH_2PO_4) p_H 7,1. Zusatz von 10 mg Thiocid/100 ml Agar. Becken- $\emptyset$: 6 mm, ihr Abstand zum Mittelpunkt: 17 mm. Anfärbung: 0,05% Amidoschwarz 10 B.

Die Kreuzreaktionen wurden unter gleichen Bedingungen in der LKB-Standard-Apparatur auf Objektträgern ausgeführt. Becken- $\emptyset$: 3 mm, ihr Abstand zum Mittelpunkt: 8 mm.

Immuno - Elektrophorese (7):

Bei der Agargel-Immuno-Elektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) wurde die Mikromethode nach SCHEIDEGGER (1955) mit der Shandon-Apparatur angewendet.

Agargel: Auf Objektträger 1% Reinagar (Behringwerke Marburg) in Na-Acetat/Na-DABS-Puffer (0,1 M Na-Acetat, 0,1 M Diäthylbarbitursäure) p_H 8,2. Zusatz von 1% Thiocid als Konservierungsmittel.

Rinne: 40 x 1,2 mm, Spannung pro Objektträger: 40 Volt, Laufzeit: 45 min.

In allen Fällen betrugen die Konzentrationen der Testsubstanzen 1 mg/ml wässrige Lösung.

9. Qualitative Aminosäureanalyse

a) Saure Proteinhydrolyse nach PÖHM (14)

1 - 2 mg absolut salzfreies Apoprotein des jeweiligen Isoenzymys bzw. Mandel-D-OxN (Iso-Gemisch) werden in einem verschlossenen PAE-Mikrozentrifugenröhrchen (Fa. Beckmann Instr.) mit überschüssigem, nach (15) aufgearbeitetem Ionenaustauscher DOWEX 50 und 0,2 - 0,4 ml 80% igem, reinem Äthanol unter Stickstoff im Schüttler (Fa. Beckmann Instr.) gemischt.

Dieses Röhrchen schmilzt man zusammen mit 2 Tropfen 80% igem Äthanol (gleiche Atmosphäre!) ebenfalls unter Stickstoff in einer Duran-Glasphiole ein und erhitzt 10 Stunden auf 95°C im Trockenschrank. Nach dem Erkalten werden die Aminosäuren mit 10% iger Ammoniumhydroxidlösung vom Austauscher eluiert und das klare, farblose Eluat am Rotavapor im Mikrokolben auf 0,1 ml eingeeengt.

b) Alkalische Proteinhydrolyse mit Ba(OH)_2 (16)

1 - 2 mg Protein werden mit 0,2 - 0,4 ml einer heiß gesättigten Lösung von Bariumhydroxid in aq. dest. unter Stickstoff in einer Duran-Glasphiole eingeschmolzen und 24 Stunden im Trockenschrank auf 125°C erwärmt.

Man überführt das Hydrolysat nach Erkalten in ein kleines Zentrifugenglas und fällt zur Entfernung der Ba-Ionen mit 2 N Schwefelsäure bis p_H 6. Nach Zentrifugieren werden der Niederschlag zweimal mit je 0,5 ml heißem Wasser gewaschen und die vereinigten Lösungen, wie unter a) beschrieben, am Rotavapor eingeeengt.

c) Dünnschichtchromatographie

Für 5 Stück Platten 20 x 20 werden:

6 g Kieselgel nach STAHL, 15 g Cellulose MN 300 (Fa. Macherey & Nagel, Düren) und 110 ml Wasser im Mixer bis

zur Homogenität durchgemischt und in 0,5 cm Schichtdicke sofort aufgezogen.

Chromatographie erfolgt nach Probenauftrag zweidimensional mit

78% Phenol/Wasser (15 cm - 6 Stunden)

Butanol: Eisessig: H_2O = 4:1:1 (15 cm - 3 Stunden)

als erster bzw. zweiter Laufstrecke.

Entwicklung: Besprühen mit 0,2% iger Lösung von Ninhydrin in Butanol.

10. Quantitative Aminosäureanalyse mit einem Nanomol-Analyzer nach KIRSTEN (19)

Ca. 1 mg absolut salzfreies Apoprotein des jeweiligen Isoenzym werden nach der unter 9.a) beschriebenen Methode hydrolysiert und das Eluat bis zur Trockne eingengt. Von diesen drei Aminosäuregemischen setzt man innerhalb einer Messreihe zum Beispiel

31,47 γ aus Apo M-D-OxN 1

10,31 γ aus Apo M-D-OxN 2

10,62 γ aus Apo M-D-OxN 3

in jeweils 30 μ l ein.

Als Kapillarsäule diente ein Teflonschlauch von 120 cm Länge u. 0,5 mm lichtigem Durchmesser, als Füllmittel AMINEX A-4 - Austauscher^{*}) (Teilchengröße 35-45 μ). Zur Förderung der Puffer- bzw. Ninhydrin-Lösungen wurden durch Synchron-Motoren über Vorsatzgetriebe gekuppelte Kolbenspritzen-Pumpen^{**}) (20ml Inhalt, Förderleistung ca. 100 μ l/Stunde) eingesetzt.

Zur Elution verwandte man:
0,2 M Citrat-Puffer p_H 3,25
0,2 M Citrat-Puffer p_H 4,25
(beide 0,25% ig an Thioglykol)

^{*}) Lieferant: Bio-Rad Labs.,
Richmond, Calif., USA

^{**}) LABOTRON-MESSTECHNIK,
Geltling b. München

D-OxN 3

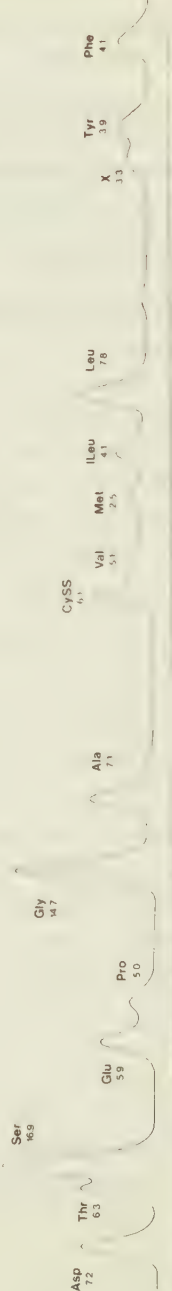


Abb. 36 Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren nach Hydrolyse von Apo M-D-OxN 3 (in Prozent)

Ninhydrin-Reagenz:

auf 100 ml 2,0 g Ninhydrin; 0,26 g Hydrindantin; 75 ml Methylcellosolve; 25 ml 4 M Acetatpuffer p_H 5,1 enthaltend 160 mg Cd-acetat in 100 ml Puffer.

Säuleneluat und Ninhydrin - Lösung werden in einem dreipoligen Verbindungsstück im Verhältnis 1:1 gemischt und durchlaufen danach ein Teflonschlauchstück (reaction coil) von 100 cm Länge im siedenden Wasserbad.

Registrierung erfolgte über ein EPPENDORF - Photometer mit Durchflußküvette*) (lichte Weite des Durchflußkanals 1 mm; Lichtweglänge 10 mm); Filter 570 mu und 440 mu.

*) Hersteller: LABOTRON - MESSTECHNIK, Gelting
b. München

11. Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung

Man führte die folgenden Untersuchungen mit einer hochstabilisierten Röntgeneinheit (Cu-Röhre) aus, wobei ein 0,01 mm starkes Nickel-Filter die K_{β} -Linie aussonderte. Gemessen wurde mit $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ (CuK_{α} -Linie). Die Bestimmung der Intensität erfolgte über ein Zählrohr mit nachgeschalteter Einheit Impulshöhen-Diskriminator/Impulszähler. Die eigentliche Aufnahmekamera ist in zahlreichen Veröffentlichungen (33) beschrieben.

Im Prinzip durchsetzt der Röntgenstrahl nach Passage des Filters ein kompliziertes Blendensystem und das Präparat. Zwischen Präparat und Zählrohr ist eine evakuierte Kammer geschaltet, um Luftstreuung zu vermeiden.

Die verdünnten Lösungen der Iso-Enzyme wurden bei Zimmertemperatur in einer sehr dünnwandigen Glaskapillare, die des Apoproteins M-D-OxN 2 in einer Kühlkuvette mit Glimmerfenstern in evakulierbarer Halterung bei 0°C vermessen.

Die Winkelverstellung (m) des Aufnahmeteils, d.h. die Abtastung des Streubereichs steuerte eine einstellbare, elektronische Programm-Automatik.

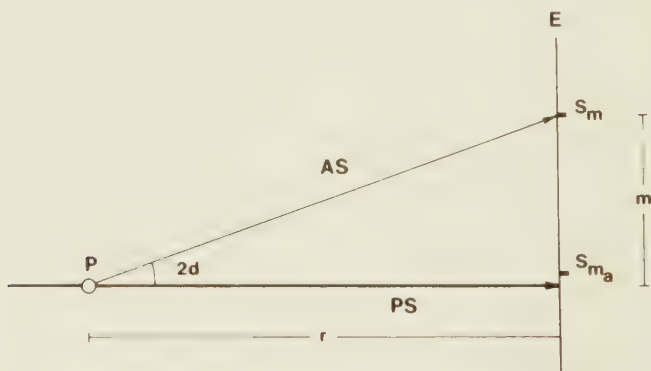


Abb.37 Primärstrahl und abgebeugter Strahl (schematisch)

r = Abstand Präparat P - Registrierebene

PS/AS = Primärstrahl/abgebeugter Strahl

s_m = Zählrohrspalt im Abstand m vom Primärstrahl-schwerpunkt bei Winkel $2d$

$m = r \cdot \tan 2d = r \cdot 2d$ (f.k.l.Winkel)

Bei Messung erhöhte sich der Wert von m schrittweise nach jeweils vorgewählter Zeit. War der eingestellte Gesamtbereich abgetastet, so lief die Automatik wieder in m_a -Stellung und begann die Registrierung von neuem.

s_{m_a} bezeichnet die Stellung des Rohrspalts nahe am Primärstrahl. Die hier ermittelte Streuintensität liefert den ersten Punkt des Innenteils der Streukurve.

Die einzelnen m -Werte wurden von einem mit der Zähleinheit kombinierten Schnelldrucker zusammen mit den zugehörigen Impulsen und der Registrierdauer ausgeworfen. Im Durchschnitt ermittelte man für einen Winkel (m) die entsprechende Streuintensität achtmal.

Mittlung und Umrechnung auf Impulse/min. erfolgte in einem elektronischen Tischcomputer (Olivetti Programma 101).

Im folgenden sind die experimentellen Ergebnisse nur für M-D-OxN 3 und Apo M-D-OxN 2 ausführlich, die für M-D-OxN 1 und M-D-OxN 2 auszugsweise angegeben.

1. Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym 3

a) Messung der Streuintensität I in Abhängigkeit von m [cm]

Es wurde grundsätzlich in derselben Kapillare zuerst das reine Lösungsmittel, dann die Lösungen aufgenommen (siehe Tabelle 7) und durch Differenzbildung (zeichnerisch) die Streuung ($\tilde{I}$) des Gelösten ermittelt.

Der Innen- und Mittelteil der Streukurven ist in Abb.38 wiedergegeben.

In Abbildung 38 sind m' -Werte abgetragen. Die wahre Abszisse hat ihr $m = 0$ im Schwerpunkt des Primärstrahls, d.h. zum Erhalt wahrer m -Werte ist die m' - Abszisse um 0,0425 Einheiten in Richtung auf den Koordinatenanfangspunkt in Abb.38 zu verschieben.

Im Außenteil, d.h. bei größeren Winkeln, verläuft die Streuung praktisch konzentrationsunabhängig. Hier wurde nur c_4 , wegen der geringen Intensitäten allerdings mit

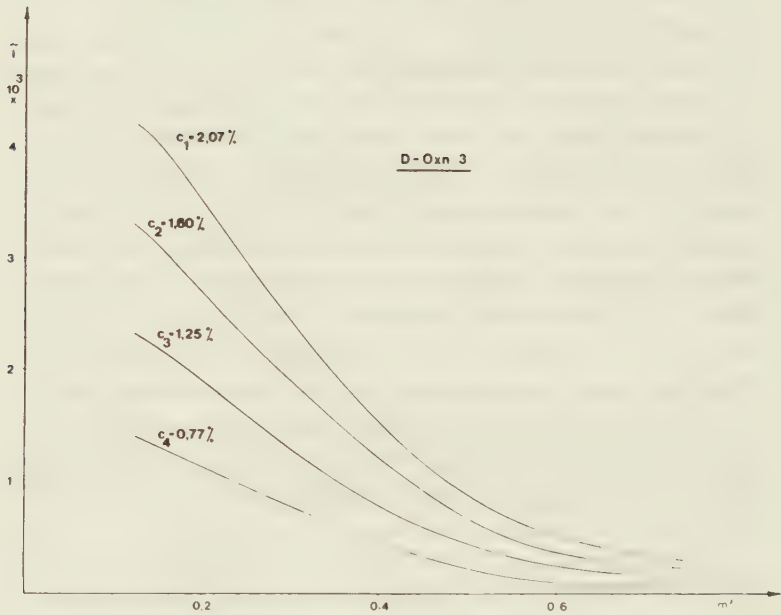


Abb.38 Innen- und Mittelteil von M-D-OxN 3

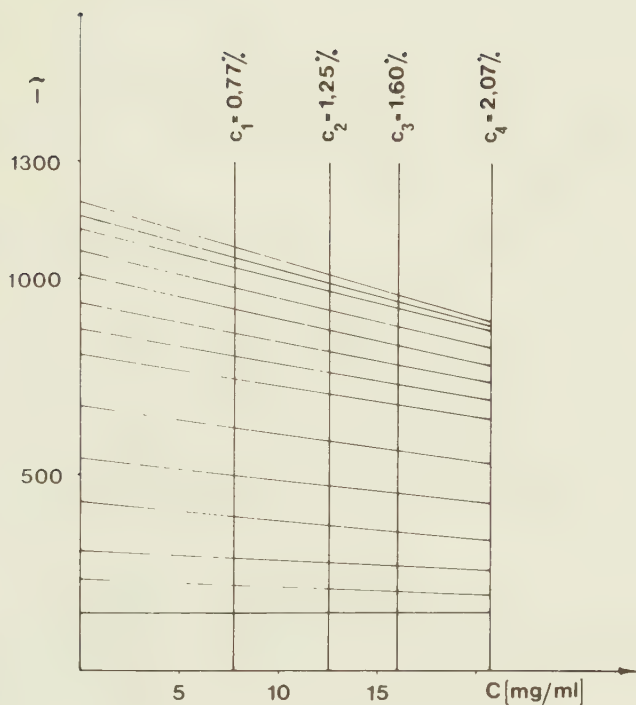
Zählrohrspaltbreite: 0,30 mm

Primärstrahlschwerpunkt: $m' = 0,0425$

größerem Zählrohrspalt vermessen (Spaltbreite: 0,60 mm,
Primärstrahlschwerpunkt: $m' = 0,0020$)

b) Extrapolation auf $C = 0$

Um das Streuverhalten im Innen- und Mittelteil frei von Aggregationseinflüssen darzustellen, wurden die einzelnen Ordinatenabschnitte jeder Kurve gegen die zugehörige Konzentration mit korrespondierendem m als Parameter abgetragen (Abb.39).



D-Oxn 3

Abb.39 Extrapolation C gegen 0

Extrapolation C gegen 0 erbringt die Ordinatenabschnitte für die Streuung einer Enzympartikel in unendlicher Verdünnung (Abb.40).

Im Einklang mit der Theorie nimmt hier die Streuungsintensität mit steigender Verdünnung stetig zu, da die Partikel untereinander immer größere Abstände erreichen und damit Interferenzeffekte fortfallen.

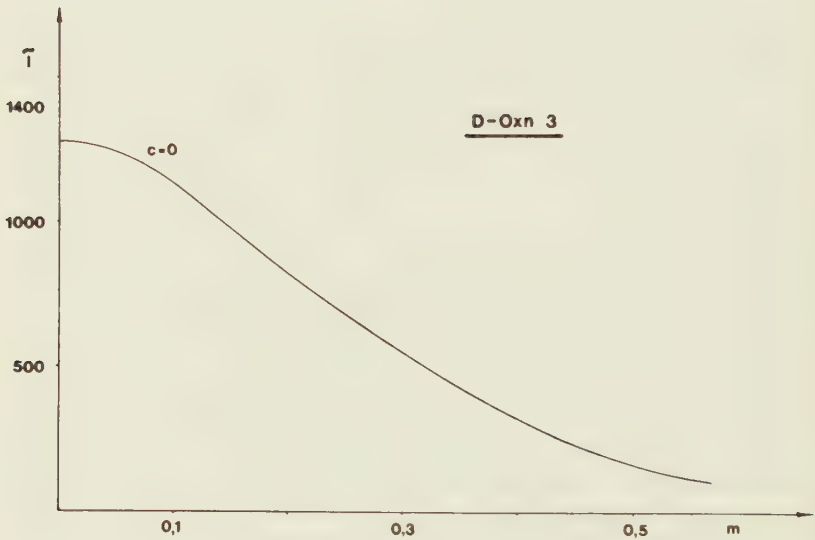


Abb.40 Innen- und Mittelteil M-D-OxN 3 ($C=0$)

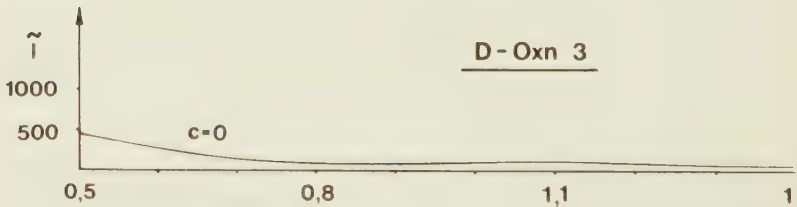


Abb.41 Außenteil M-D-OxN 3

Der Schnittpunkt mit der Ordinate und der innerste Teil der Kurve in Abb.40 wurde über eine GUINIER - Näherung (siehe theoretischer Teil) erhalten (Abb.42).

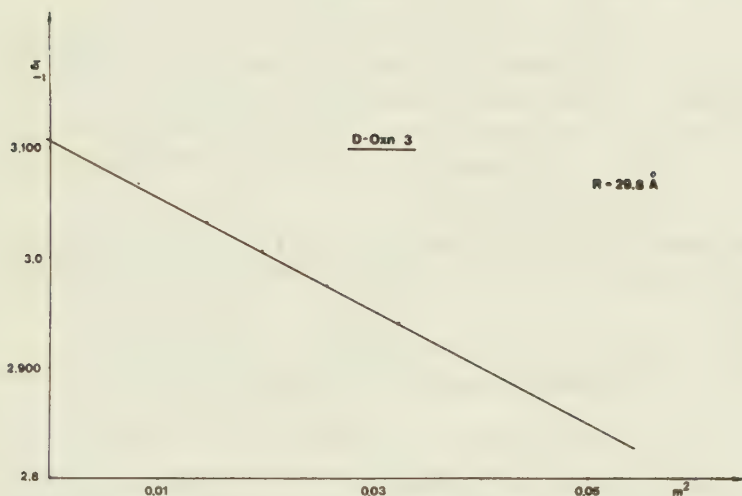


Abb.42 M-D-OxN 3 (GUINIER-Darstellung)

Durch Aneinandermultiplikation der in Abb.40/41 wiedergegebenen Verläufe erhält man schließlich eine Gesamtstreu-
kurve von M-D-OxN 3, $\tilde{I}$ (I-verschmiert) gegen m .

c) Entschmierung der Streukurve $C = 0$

Der Begriff "verschmiert" berücksichtigt folgende Überlegung:

Von theoretischer Seite aus bezieht man Röntgenkleinwinkelstreuungen bzw. Streuungen überhaupt auf eine unendlich kleine, punktförmige Strahlungsquelle. Von der praktischen Seite her ist man aus Intensitätsgründen gezwungen, mit einem rechteckigen Primärstrahlbündel endlichen Querschnitts zu arbeiten.

Die Ausbreitung der Streuwellen bei der Messung erfolgt also nicht in Form von konzentrischen Kreisen, sondern ist, um bei diesem Bild zu bleiben, "elliptisch verschmiert" (33).

Um das wirkliche Streuverhalten einer Partikel exakt zu ermitteln, ist man also gehalten, die praktisch mit einem rechteckigen Primärstrahlquerschnitt bekommenen Verhältnisse auf die eines unendlich kleinen, punktförmigen Querschnitts zurückzuführen.

Diese Operation wurde mathematisch in dankenswerter Weise vom Rechenzentrum der Technischen Hochschule Graz durchgeführt.

Abb.22, Seite 34 gibt die "entschmierte" Streukurve von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym 3 wieder.

d) Berechnung der Molekülabmessungen

Die Formbestimmung des Körpers M-D-OxN 3 (siehe Seite 36) wurde vom Außenteil her, d.h. von der Lage des Nebenmaximums, vorgenommen, da der Innenteil der experimentellen Kurve vom theoretischen Streuverlauf abwich (Aggregation).

Sie ergab einen Kreiszylinder mit dem Achsenverhältnis $2r : H = 1 : 1$. Der ermittelte Streumassenradius $R_{exp.} = 32,7 \text{ \AA}$ war mit Sicherheit zu groß.

Durch Vergleich mit der theoretischen Kurve des Körpers kann der eigentlich zutreffende Streumassenradius berechnet werden (27).

$lg u = 1,0$ $u = 10$ (Abszisse theor.Kurve) entspricht
 $lg m = 0,4$ $m = 2,51$ (Abszisse exp.Kurve)

$$R = \frac{u}{m} \cdot \frac{a}{2\lambda}$$

$$\lambda = 1,54 \text{ \AA}$$

$$a = 20,3 \text{ cm}$$

(λ = Wellenlänge bei Messung, a = Abstand Präparatregistrierebene)

Danach ergibt sich der eigentliche Streumassenradius von M-D-OxN 3 zu $20 \text{ \AA}$.

Der Streumassenradius eines Kreiszylinders $2r : H = 1 : q$ errechnet sich theoretisch zu:

$$R^2 = \frac{r^2}{2} + \frac{H^2}{12} \quad (25,26)$$

Im Fall $2r : H = 1 : 1$ und $R_{\text{ber.}} = 20 \text{ \AA}$ gilt:

$$R^2 = \frac{r^2}{2} + \frac{4r^2}{12}$$

$$r = R \cdot \sqrt{\frac{6}{5}}$$

$$r = 22 \text{ \AA}$$

Damit ergibt sich für den Durchmesser des Kreiszylinders und dessen Höhe jeweils der Wert $44 \text{ \AA}$.

2. Apoprotein von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym 2

a) Aggregationsverhalten

Wie schon im theoretischen Teil erwähnt, erwies sich das Apoprotein als ein, vor allem gegen Temperatureinflüsse, sehr empfindlicher Körper.

Erste, orientierende Untersuchungen der Kleinwinkelstreuung^{*)} in Pyrophosphat-Puffer mit und ohne NaCl-Zusatz zeigten, daß frisch hergestelltes Apoprotein bereits im Gang der Messung merkbar zu höheren Aggregaten assoziierte.

Nach eigenen Erfahrungen scheint Ammoniumsulfat außer seinem Fällungsvermögen auf ein gefälltes Protein eine strukturstabilisierende Wirkung auszuüben (vgl. Enzymdarstellung, Herstellung größerer Mengen eigenschaftsgleichen, resynthesefähigen Apoproteins^{*)}).

Dieser Effekt ließ sich vom ausgefällten Produkt auf gelöstes Apoprotein ausweiten.

Abb.43 zeigt M-D-OxN-Apoprotein (aus Iso-Gemisch) in Pyrophosphat-Puffer/0,4 M an NaCl, p_H 7,5 unter verschiedenen Lagerungsbedingungen nach Durchlauf einer 100 cm langen Sephadex G-150 - Säule bei 0°C .

*) siehe meine Diplomarbeit 1966

Einem mehr oder minder starken Anteil von aggregiertem Produkt (Peak 1) folgt intaktes, resynthesefähiges Apoprotein (Peak 2) nach.

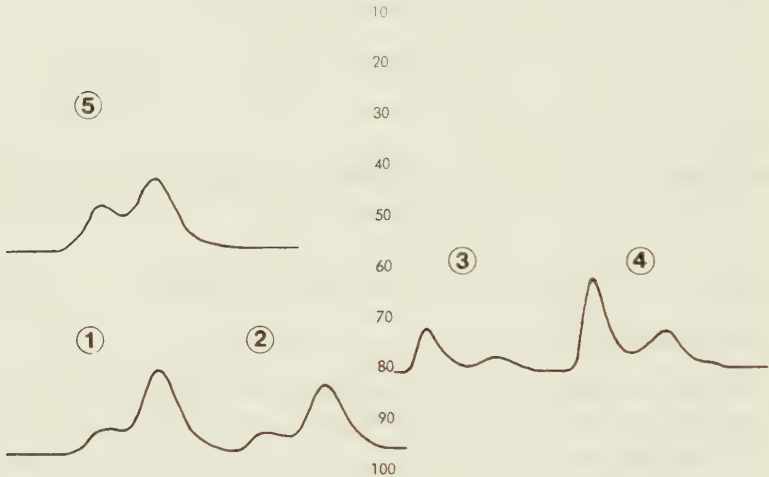


Abb.43 Trennung von aggregiertem und unaggregiertem M-D-OxN-Apoprotein an Sephadex G-150 bei 0 Grad

- 1 Apoprotein in 0,1 M Pyrophosphatpuffer/0,4 M an NaCl, p_H 7,5; sofort nach Spaltung aufgegeben.
- 2 wie 1; jedoch nach Spaltung 4 Stunden in Puffer gelöst bei 0 Grad gelagert.
- 3 Mit Ammonsulfat ausgefälltes Apoprotein wurde ein halbes Jahr bei -18 Grad gelagert, dann in unter 1 angegebenem Puffer von 0 Grad gelöst und aufgegeben.
- 4 wie 1; jedoch nach Spaltung 30 Minuten bei 25 Grad gelagert.
- 5 Apoprotein in reinem Puffer ohne Neutralsalzzusatz gelöst und 4 Stunden bei 0 Grad gelagert.

Zusatz von 0,2 M Ammonsulfat zu reinem Puffer (Abb.44) erbringt schon abgeänderte Verhältnisse, in Pyrophosphatpuffer/0,4 M an Ammonsulfat scheint, wenigstens unter diesen Testbedingungen, einheitliches Apoprotein vorzuliegen.

Diese Lösungsmittelbedingungen mit Hinblick auf Schaffung einer Monodispersität allein vom Milieu her, wurden in Folge sowohl für die einzelnen Isoenzyme (auch für zuvor vermessenes M-D-OxN 3) als wie für Apo M-D-OxN 2 eingehalten.

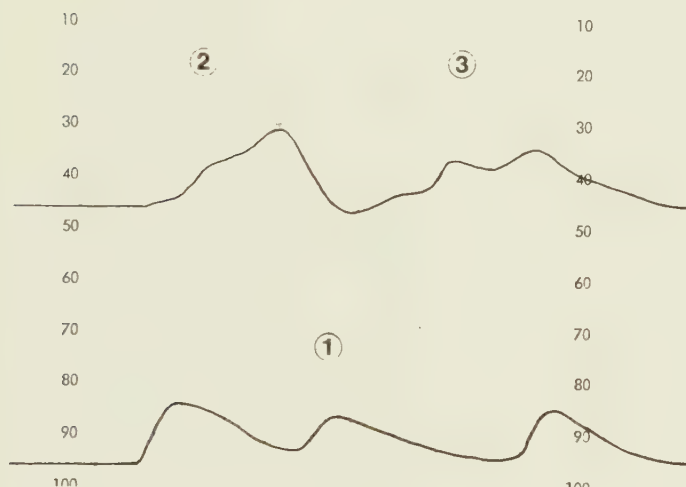


Abb.44 Trennung von aggregiertem und unaggregiertem M-D-OxN-Apoprotein an Sephadex G-150 bei 0 Grad

- 1 drei hintereinander aufgegebene Proben Apoprotein in Pyrophosphat-Puffer/0,4 M an Ammonsulfat zeigen keine Aggregatbildung.
- 2 Probe aufgetragen sofort nach Spaltung, Puffer nur 0,2 M an Ammonsulfat.
- 3 ausgefälltes Apoprotein 12 Stunden bei -18 Grad gelagert, dann in unter 2 angegebenem Puffer von 0 Grad gelöst.

b) Messung der Streuintensität I in Abhängigkeit von
m [cm]

Die Differenzkurven - Gelöstes minus Lösungsmittel -, erhalten aus separater Vermessung von Innen- und Mittelteil, gibt Abb.45 wieder.

Ein Außenteil (Nebenmaxima) ist nicht vorhanden.

Zählrohrspaltbreite: 0,10 mm (Innenteil)

0,30 mm (Mittelteil)

Primärstrahlenschwerpunkt: $m' = 0,0660$ bei Messung des Innenteils

$m' = 0,0400$ bei Messung des Mittelteils

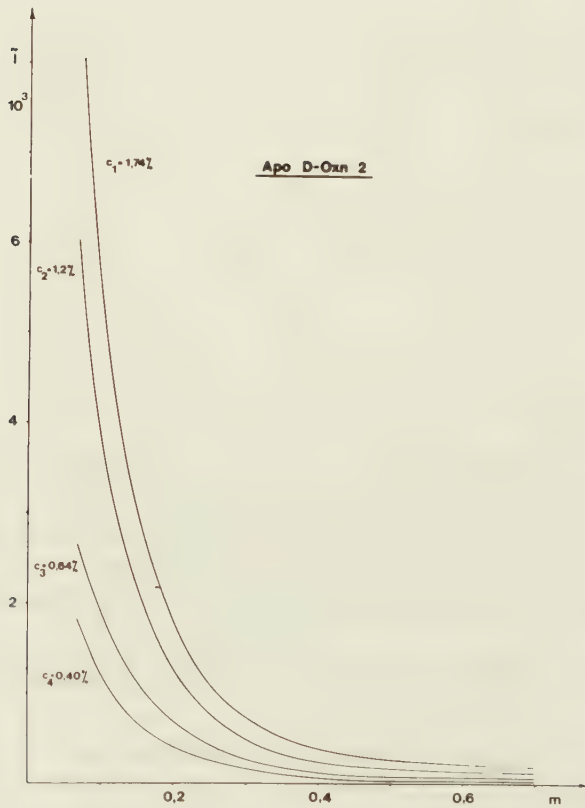
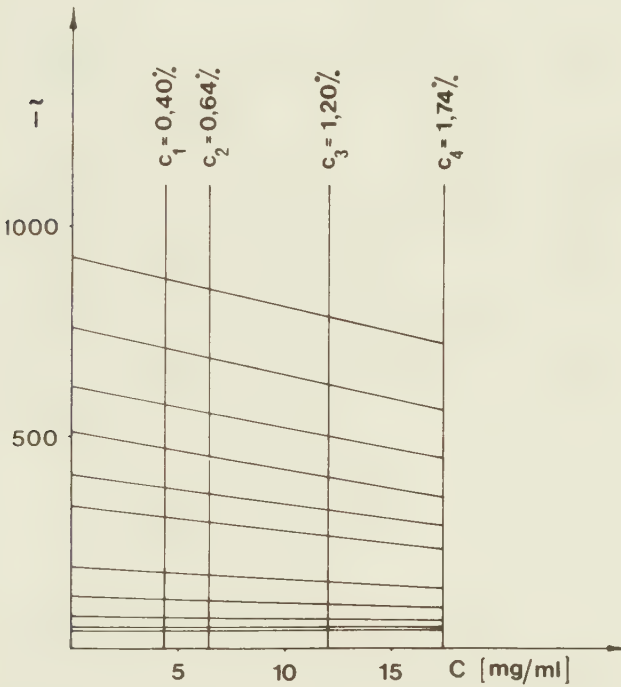


Abb. 45 Innen- und Mittelteil von Apo M-D-OxN 2

c) Extrapolation auf $C = 0$

Sie bringt analog 11. 1.b ein sinnvolles Streuverhalten, d.h. die Intensitäten bei $C = 0$ liegen höher als die der niedrigsten vermessenen Konzentration.



Apo D-OxN 2

Abb.46 Extrapolation C gegen 0

Aus den ermittelten Ordinatenabschnitten bei $C = 0$ und der GUINIER-Darstellung läßt sich die verschmierte Streukurve von Apo M-D-OxN 2 bei $C = 0$ konstruieren.

Rechnerische Entschmierung ergibt letztlich die realen Streuverhältnisse (Abb.23, Seite 35).



Abb. 47 Apo M-D-OxN 2 (GUINIER-Darstellung)

d) Berechnung der Molekülabmessungen

Die experimentell ermittelte Streukurve von Apo M-D-OxN 2 (mit $\bar{R} = 50,7 \text{ \AA}$) entsprach in ihrem gesamten Verlauf der theoretisch errechneten Kurve eines Rotationsellipsoids mit dem Achsverhältnis $a:b:c = 1:1:0,5$ (siehe Seite 37).

Der Streumassenradius eines solchen Körpers errechnet sich theoretisch zu:

$$\bar{R}^2 = \frac{1}{5} (a^2 + b^2 + c^2) \quad (25,26)$$

Mit $\bar{R} = 50,7 \text{ \AA}$ ergibt sich:

$$R^2 = \frac{1}{5} \left(2a^2 + \frac{a^2}{4} \right)$$

$$a = \frac{50,7 \cdot 2 \cdot \sqrt{5}}{3} = 78 \text{ \AA}$$

Damit erhält man für die große Achse 78 Å, für die kleine Achse 39 Å.

3. Messung der Röntgenkleinwinkelstreuung an den Isoenzymen
M-D-OxN 1 und M-D-OxN 2

Hier zeigt sich im Gegensatz zu den bisher untersuchten zwei Substanzen bei der Extrapolation der Streuintensitäten gegen 0 eine fallende Tendenz der Kurvenscharen und damit ein anomales Verhalten, das auf eine starke Aggregation schließen läßt (Abb.48).

Bei Aufnahme des Außenteils der Streukurven erschienen aus gleichem Grunde die Nebenmaxima, die zweifellos vorhanden sind, derart verzeichnet, daß auf ihre Wiedergabe verzichtet wurde.

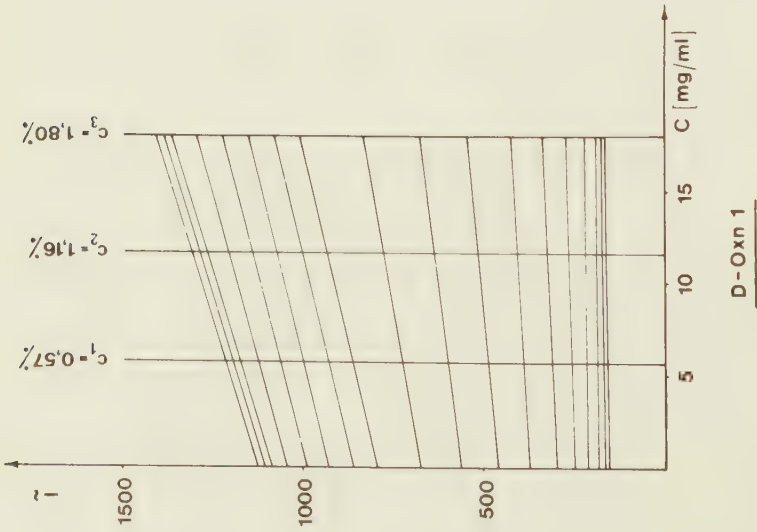
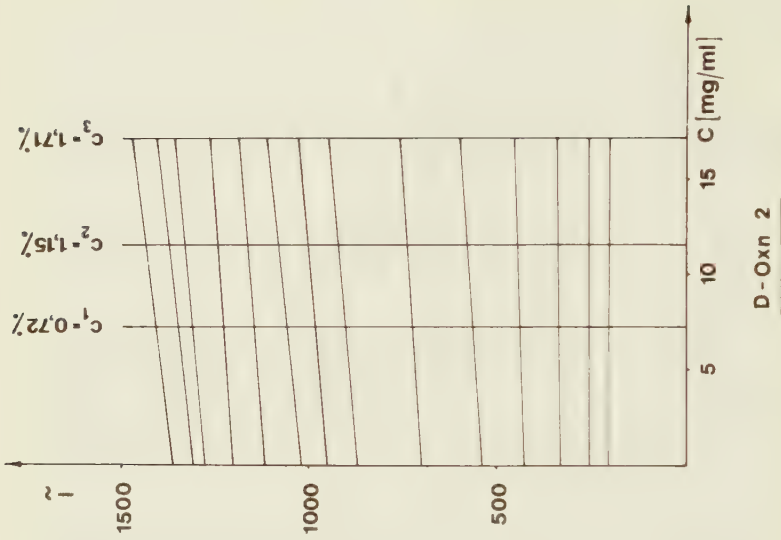


Abb.48 Extrapolation C gegen 0

Bestimmung der Primärstrahlschwerpunkte

Durchläuft der Zählrohrspalt in Abb.37 direkt den Primärstrahl, so herrschen hier ungleich höhere Intensitäten als im eigentlichen Streubereich der Partikel.

Damit ist verständlich, warum bei Ermittlung einer Streukurve mit optimaler Spaltöffnung ab Stellung " m_s ", d.h. nur bis nahe an den Primärstrahl heran gemessen wird (vgl. Abb.37).

Zur Ermittlung seines Schwerpunkts wird der gesamte Primärstrahlbereich mit stark verminderter Intensität (Filter) durchfahren. Abb.49 zeigt seine, durch das Blenden-system konstruktionsbedingte Asymmetrie. Die steil abfallende Flanke liegt in Richtung auf höhere m - Werte (Winkel).

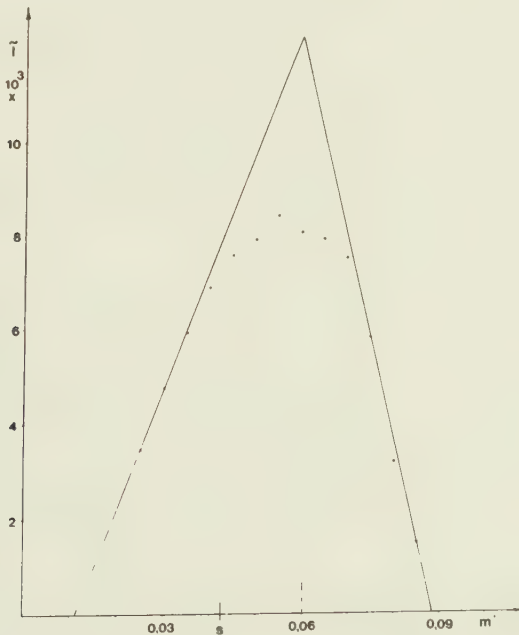


Abb.49 Primärstrahl bei Zählrohrspaltbreite von 0,3 mm

In dem obigen dargestellten Fall errechnet sich der Primärstrahlsschwerpunkt zu:

$$\begin{array}{r|l} 0,0113 & \\ 0,0602 & + \\ 0,0885 & \\ \hline 0,1600 & : 3 = 0,0533 - 0,0100^*) \\ & S_{PS} = 0,0433 \end{array}$$

Für die Messung, in diesem Falle M-D-OxN 3 - Innenteil, wurde der Wert 0,0425 eingesetzt. (Vgl. Seite 71, 1,a) und Abb. 38)

*) Experimenteller Faktor aus dem Verhältnis zweier Spalte in der Kamera

Literaturverzeichnis

- (1) L.Rosenthaler, Biochem.Z. 14, 235 (1908)
Arch.d.Pharm. 251, 56 (1913)
- (2) E.Nordefeldt, Biochem.Z. 118, 15 (1921)
Biochem.Z. 131, 390 (1922)
Biochem.Z. 137, 489 (1923)
Biochem.Z. 159, 1 (1925)
- (3) H.Albers, K.Hamann; Biochem.Z. 255, 44 (1932)
Biochem.Z. 269, 14 (1934)
H.Albers, K.Hamann, H.Albrecht; Biochem.Z. 269, 26
(1934)
H.Albers, H.Albrecht; Biochem.Z. 269, 43 (1934)
H.Albers, I.u.K.Meyer; Biochem.Z. 269, 35 (1934)
- (4) U.Benthin, Diplomarbeit Marburg 1958
Dissertation Marburg 1959
- (5) E.Eschenhof, Diplomarbeit Marburg 1961
Dissertation Marburg 1962
- (6) W.Becker, Diplomarbeit Marburg 1962
Dissertation Marburg 1964
W.Becker, U.Benthin, E.Eschenhof, E.Pfeil;
Angew.Chem. 75, 93 (1963)
Biochem.Z. 337, 156 (1963)
W.Becker, E.Pfeil; Biochem.Z. 346, 301 (1966)
- (7) Ö.Ouchterlony, Arkiv Kemi Mineral.Geol. 26 B, 1
(1949)
J.J.Scheidegger, Int.Arch.Allergy 7, 103 (1955)
Laboratoriumsblätter der Behringwerke AG Marburg,
Ausgabe Mai 1964
- (8) R.V.Tomlinson, G.M.Tener; Biochem.Z. 2, 697 (1963)
Whatman Technical Bulletin IE 2 u.C5 (Juli 1965)
- (9) P.Grabar, P.Burtin; L'analyse immunoélectrophorétique,
Paris: Masson & Cie (1960)
P.Grabar, C.A.Williams; Biochim.biophys.Acta (Amst.)
10, 193 (1953)

- (10) O.Vesterberg, T.Wadström, K.Vesterberg, H.Svensson;
 Biochim.Biophys.Acta 132, 435 (1967)
 T.Flatmark, O.Vesterberg; Acta Chem.Scand. 20,
 1947 (1966)
 "Science Tools", the LKB Instrument Journal
 Vol. 14, No.2 August 1967
 Vol. 15, No.1 April 1968
- (11) I.R.Whitacker, Anal.Chem. 35, 1950 (1963)
 P.Andrews, Biochem.J. 91, 222 (1964)
 Biochem.J. 92, 627 (1964)
 A.A.Leach, P.C.O'Shea; J.Chromatog. 17, 245 (1965)
 P.R.Carnegie, Nature 206, 1128 (1965)
- (12) O.Kratky, Naturwiss. 42, 244 (1955)
- (13) P.Strittmatter, J.Biol.Chem. 236-8, 2329 (1961)
- (14) M.Pöhm, Naturwiss. 48, 551 (1961)
- (15) H.E.Schultze, A.Schmidtberger, H.Haupt; Biochem.Z.
 329, 490 (1958)
- (16) F.Kramer; Papierchromatographie 4.Auflage (1958)
 S.88 ff.
- (17) E.u.M.Lederer; Chromatography, Elsevier 1953
- (18) F.Kramer, Papierchromatographie 4.Auflage (19)
 S.91
- (19) St.Moore, W.H.Stein; J.Biol.Chem. 211, 893 (1954)
 E.und R.Kirsten; Biochem.Z. 339, 287 (1964)
- (20) Die Physik der Hochpolymeren, Bd.II; herausgeg.v.
 H.A.Stuart,Berlin: Springer 1953
 J.T.Edsall, W.D.Dandliker; Fortschr.chem.Forsch.
 2, 1 (1951)
 P.Putzeys, J.Brosteaux; Trans.Faraday Soc. 31,
 1414 (1935)
- (21) G.Oster, P.Zimm, H.Doty; J.Amer.Chem.Soc. 69, 1193
 (1947)
- (22) O.Kratky; Kolloid-Z., Z.f.Polymere 182, 7 (1962)
- (23) A.Guinier; Ann.Physique 12, 161 (1939)
 J.Chim.physique 40, 133 (1943)

- (24) O.Kratky, A.Sekora; Naturwiss. 31, 46 (1943)
O.Kratky; Mh.Chem. 76, 325 (1947)
O.Kratky, G.Porod; Acta Physica Austriaca 2, 133
(1948)
- (25) G.Porod; Acta Physica Austriaca 2, 255 (1948)
P.Mittelbach, G.Porod; Acta Physica Austriaca 14,
405 (1961)
P.Mittelbach, G.Porod; dto. 15, 122 (1962)
- (26) O.Kratky; Angew.Chem. 72, 467 (1960)
O.Kratky; Makrom.Chem. 35A, 12 (1960)
O.Kratky, I.Pilz, P.J.Schmitz, R.Oberdorfer;
Z.Naturforschg. 18b, 180 (1963)
A.Holasek, O.Kratky, P.Mittelbach, H.Wawra;
Biochim.Biophys.Acta 79, 76 (1964)
- (27) H.Wawra; pers. Mitteilung
- (28) L.Ornstein, B.J.Davies; Disc-electrophoresis
New York 1962
L.Ornstein; Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321 (1964)
121, 404 (1964)
H.R.Maurer; Disc-Elektrophorese, W.de Gruyter (1968)
- (29) W.Rudolph; Staatsexamensarbeit Marburg 1965
- (30) K.L.Kilgour, J.P.Felton, F.M.Hunneekens;
J.Amer.Chem.Soc. 79, 2254 (1957)
- (31) F.Haurowitz; Vortrag; i.Behringwerk-Mitteilungen
Heft Nr.45 (1966)
- (32) P.Flodin, B.Gelotte, J.Porath; Nature 188, 493
(1960)
R.D.Levere, J.Levine; J.clin.Path. 16, 183 (1963)
- (33) O.Kratky, Z.Skala; Z.Elektrochem. 62, 73 (1958)
O.Kratky, A.Sekora; Monatsh.Chem. 85, 660 (1954)
- (34) O.Kratky, G.Porod, Z.Skala; Acta Physica Austriaca
13, 76 (1960)

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. Emanuel Pfeil danke ich aufrichtig für seine stets wohlwollende, anregende und diskussionsfreudige Hilfe und Unterstützung im und um den Rahmen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt den Herren Professor Dr. O. Kratky und Dr. H. Wawra sowie Herrn Professor Dr. A. Holasek vom Institut für physikalische Chemie bzw. physiologische Chemie der Universität Graz, die mir in so entgegenkommender Weise präparative Arbeiten und Messungen über längere Zeit in ihren Instituten ermöglichten.

Herrn Dr. E. Geyer, Zoologisches Institut der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Unterstützung auf immunologischem Gebiet.

Lebenslauf

Am 25. Mai 1934 wurde ich als Sohn des Diplom-Kaufmanns Friedrich Aschhoff und seiner Ehefrau Marie, geborene Schmalenbach, in Breslau geboren.

Nach Besuchen der Volksschulen in Hannover und Stuttgart und des Märkischen Gymnasiums in Iserlohn legte ich dort im Jahre 1954 die Reifeprüfung ab.

1955 wurde ich zum Chemiestudium an der Philipps-Universität Marburg zugelassen. 1964 bestand ich die Diplomchemiker-Hauptprüfung und erhielt 1966 das Diplom.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1967 bis September 1968 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Emmanuel Pfeil.

Meine akademischen Lehrer waren:

Balli, Böhme, Dimroth, Hafner, Hengge, Hock, Hünig, Huster, Kautsky, Kirmse, Kuhn, Mahr, Müller, Musso, Pfeil, Schmid, Schmidt, Schütte, Schultheis, Walcher, Winkler, Witt und Witzel.

